

Phosphorylierungsspektrum BMP- abhängiger intrazellulärer Signalwege nach Aktivierung

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Franziska Heuchel**

Geboren am 06.03.1981 in Bad Frankenhausen

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus, Jena

Zweiter Gutachter: apl. Prof. Dr. med. Alexander Berndt, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. rel. nat. habil. Stefan Wölfl, Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.09.2012

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
A	Ampere
ActR	Actin humane hormone receptor
AKT	Actin humane hormone
AMH	anti müllerian hormone
AMHR	anti müllerian hormone receptor
AS	Aminosäure
BMP	bone morphogenetic proteine
CDMP-1	cartilage-derived morphogenetic protein-1
cDNA	complementary DNA
Co-Smad	common-Smad
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dimethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPP	Dipeptidyl Peptidase
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EDTA	Etylendiamintetraacetat
eD ALK-3	extrazelluläre Domäne Aktivin receptor like Kinase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
fmol/mg	Femtomol pro Milligramm
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GDF	growth and differentiation factor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ID-1	Inhibitor of differentiation-1
JunK	c-Jun N-terminalen Kinase
kDa	Kilodalton
LAS	Luminescent Image Analysis System
LJ	Lebensjahr
log	Logarithmus

M	molar (Mol pro Liter)
MAD	mother against decapentaplegic
MAP	Mitogen Aktivierendes Protein
MES	2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OP-1	osteogenetic proteine
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
Raf-Protein	rapidly growing fibrosarcoma-Protein
Ras-Protein	rat sarcoma-Protein
rh	recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
R-Smad	Rezeptorregulierendes Smad
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMA	small body size
<i>Taq</i> -polymerase	Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris base
TGF- β	transforming growth factor beta
TGF- β R	transforming growth factor beta Rezeptor
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
u.a.	und andere
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Inhaltsverzeichnis.....	III
1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Zellulärer Mechanismus und Signaltransduktion	3
2.2	TGF- β Superfamilie	3
2.3	Modulation der Signalwege	7
2.4	BMP	8
2.5	Biologische Aktivitäten der BMPs	13
2.6	BMPs im Tumorgeschehen	14
2.7	Das Mammakarzinom im Zusammenhang mit den BMPs.....	15
2.8	Zielsetzung der Arbeit.....	17
3.	Material.....	18
3.1	Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7.....	18
3.2	Wachstumsfaktoren.....	18
3.3	Kommerzielle Kits.....	18
3.4	Zubehör	19
3.5	Antikörper	19
3.6	Puffer.....	20
3.7	weitere Reagenzien.....	21
3.8	Geräte.	22
4.	Methoden	24
4.1	Zellbiologische Methoden	24
4.1.1.	Die Zelllinie MCF-7	24
4.1.2.	Zellkultivierung.....	24
4.1.3.	Zellaussaat.....	25
4.1.4.	Inkubationsversuche	25
4.2	Molekularbiologische Methoden	26
4.2.1.	RNA-Isolierung	26
4.2.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
4.2.3.	cDNA-Synthese.....	27
4.2.4.	quantitative RT-PCR am LightCycler.....	28
4.3	Western Blot zur Proteinbestimmung.....	31
4.3.1.	Proteinisolierung aus der Zellkultur und Konzentrationsbestimmung	31
4.3.2.	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	32
4.3.3.	Auftrennung der Proteine durch SDS-Gel-Elektrophorese	32

4.3.4.	Elektrotransfer-Blotten	33
4.3.5.	Rehybridisierung	35
4.4	FACS-Analyse	35
4.4.1.	Aufbau und Funktionsweise des Durchflusszytometers	35
4.4.2.	Probenherstellung und Datenauswertung.....	37
5.	Ergebnisse	38
5.1	Effekte von BMP-2.....	39
5.1.1.	Effekte von BMP-2 auf die mRNA Ebene	39
5.1.2.	Effekte von BMP-2 auf die intrazelluläre Signaltransduktion	41
5.1.3.	Zusammenfassung	44
5.2	Effekte von BMP-3, BMP-6 und BMP-7	44
5.2.1.	Effekte von BMP-3 auf mRNA Ebene	44
5.2.2.	Effekte von BMP-3 auf die intrazelluläre Signaltransduktion	46
5.2.3.	Effekte von BMP-6 auf mRNA Ebene	49
5.2.4.	Effekte von BMP-6 auf die intrazelluläre Signaltransduktion	50
5.2.5.	Effekte von BMP-7 auf mRNA Ebene	51
5.2.6.	Effekte von BMP-7 auf die intrazelluläre Signaltransduktion	52
5.3	Zusammenfassung der BMP-Modulation intrazellulär	53
5.4	Effekte von Noggin.....	55
5.4.1.	Effekte von Noggin auf mRNA Ebene.....	55
5.4.2.	Effekte von Noggin auf die intrazelluläre Signaltransduktion.....	56
5.5	Effekte von eD ALK-3	57
5.5.1.	Effekte von eD ALK-3 auf mRNA Ebene	57
5.5.2.	Effekte von eD ALK-3 und eD ALK-3+BMP-2 auf die intrazelluläre Signaltransduktion.....	58
5.6	Auswirkungen der Konzentrationsänderungen ausgewählter BMPs und eD ALK-3	60
5.6.1.	konzentrationsabhängige Induktion der Smad1/5/8-Phosphorylierung durch BMP-2.....	61
5.6.2.	konzentrationsabhängige Induktion der Smad1/5/8-Phosphorylierung durch BMP-6.....	62
5.6.3.	konzentrationsabhängige Induktion der AKT-Phosphorylierung durch BMP-6.....	64
5.6.4.	konzentrationsabhängige Induktion der Smad1/5/8- und AKT-Phosphorylierung durch eD ALK-3 und eD ALK-3+BMP-2.....	66
5.7	Zusammenfassung der Konzentrationsänderungen	68
5.8	Nachweis phosphorylierter Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	69
5.8.1.	Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von PMA.....	69
5.8.2.	Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von Anisomycin.....	73
5.8.3.	Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von BMP-2	73
5.8.4.	Validierung der Durchflusszytometrie-Daten von Western Blot-Untersuchungen	76
6.	Diskussion	81

III. Literaturverzeichnis.....	VI
IV. Anhang	XIII

1. Zusammenfassung

Bone morphogenetic proteins (BMPs) als Mitglieder der TGF- β Superfamilie sind in eine Vielzahl von extra- und intrazellulären Prozessen involviert. Sie können hierbei sowohl aktivierende als auch inhibierende Wirkungen ausüben und spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms. Durch BMPs werden im Zusammenspiel mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte auf die Zelle ausgelöst. Diese äußerst komplexen Signal-„crosstalks“ erfolgen im Extrazellulärraum, auf Liganden-Rezeptorebene sowie intrazellulär.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss ausgewählter BMPs auf die Aktivität endogener Signalmoleküle unterschiedlicher Transduktions- und Transkriptionswege anhand der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. Dazu fanden neben der Zellkultivierung die molekularbiologischen Verfahren Western Blot (Proteinebene), Real Time-quantitative-PCR (DNA-Ebene) und die Durchflusszytometrie (Zelluläre Ebene) Anwendung. Mithilfe ausgewählter Signalproteine (Smad, AKT-, p38- und ERK1/2-MAP-Kinase) wurden die intrazellulären Effekte von BMP-2, BMP-3, BMP-6 und BMP-7 experimentell untersucht und ausgewertet. Durch Bestimmung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstärke mithilfe phosphorylierter und nichtphosphorylierter Antikörper konnte die Aktivität der Signalproteine ermittelt werden.

Die erhobenen Daten unterstützen Aussagen, dass BMP-2, BMP-6 und BMP-7 eine wichtige Rolle in der Tumorprogression des Mammakarzinoms spielen. Im Gegensatz hierzu besitzt BMP-3 keine zellmodulierenden Effekte an der untersuchten Zelllinie, wodurch dessen Sonderrolle innerhalb der TGF- β -Familie unterstrichen wird.

Besondere Beachtung verdient weiterhin die Tatsache, dass die BMP-vermittelte Modulation der Zellproliferation der MCF-7-Zelllinie sowohl konzentrations-, als auch zeitabhängig ist. Daher wurden die Mammakarzinomzellen nach unterschiedlicher Inkubationsdauer (4h und 8h) analysiert. Es wurden BMP-Konzentrationen von 50nM, 100nM und 200nM eingesetzt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die BMP-induzierte Aktivität der MCF-7 Zellen einen Schwellenwert aufweist und dass in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer die Bindungsaffinität des Liganden am Rezeptor variiert.

BMP-Liganden binden zunächst an BMP-Typ-I-Rezeptoren, anschließend erfolgt aufgrund der Phosphorylierung dieses Rezeptor-Typs die Komplexierung mit dem BMP-Typ-II-Rezeptor. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit BMP-2 und eD ALK-3 als Vertreter des BMP-Typ-I-Rezeptors eine starke Aktivitätssteigerung des Signalproteins Smad1/5/8 und des Signalproteins AKT-Kinase auslöste, während die BMP-2-freie Inkubation keinen Effekt zeigte.

Smad-Proteine sind wichtige intrazelluläre Signalmoleküle, die sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte vermitteln können. Beispielhaft konnte anhand der hier untersuchten BMPs nachgewiesen werden, dass das Signalprotein Smad1/5/8 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer durch BMP-2, BMP-6 und BMP-7 aktiviert wird, um eine Proliferation der MCF-7-Zellen zu erzielen.

AKT-Kinase ist besonders an der Signaltransduktion für Zellwachstum und Zellzykluskontrolle beteiligt. Die erhobenen Daten zeigen neue Erkenntnisse, dass BMP-6 die Motilität und Invasivität der MCF-7 Zellen durch Aktivierung des AKT-Kinase-Signalweges fördert.

Die in der Literatur beschriebene Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch BMP-2 konnte in der semiquantitativen Analyse auf Proteinebene mittels Western Blot weder nach 4h noch nach 8h Inkubationsdauer nachvollzogen werden. Hingegen zeigte sich nach der deutlich kürzeren Inkubationsdauer von nur 30min mit Hilfe des sensitiveren Verfahrens der Durchflusszytometrie eine deutliche Aktivierung des ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweges, was erneut die Komplexität der BMP-Effekte unterstreicht.

Ergänzende Untersuchungen fanden mit Noggin, einem extrazellulären Polypeptid und Antagonist vieler BMPs (-2,-7) statt. Die erhobenen Daten bestätigen, dass Noggin über einen negativen Feedback-Mechanismus die Antwort der MCF-7 Zellen auf eine Inkubation mit BMPs abschwächt.

Insgesamt können im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf unterschiedlichen Ebenen (Transkription/ mRNA-, Protein-, zelluläre Ebene) durch Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden Aspekte der Komplexität der sowohl inhibierenden als auch aktivierenden Effekte von BMPs genauer verstanden werden. Hierbei konnten einige bekannte Interaktionen genauer spezifiziert werden, zusätzlich konnten auch bisher nicht beschriebene Sachverhalte wie die Aktivierung von AKT-Kinase durch Inkubation der Zellen mit BMP-6 neu herausgearbeitet werden.

2. Einleitung

2.1 Zellulärer Mechanismus und Signaltransduktion

Der zelluläre Organismus besitzt vielseitige strukturelle und funktionelle Fähigkeiten, die eine exakte Abstimmung biochemischer Reaktionen in den Zellen voraussetzt. Durch die intrazelluläre Kommunikation und Bildung spezifischer Signale der Zelle wird der Prozess der Signaltransduktion und -weiterleitung ermöglicht. Auslöser können Botenstoffe wie Proteine und niedermolekulare Substanzen, elektrische und optische Stimuli sein. Membranständige oder zytosolische Rezeptoren in der Zielzelle empfangen und binden das Signal. Eine sich anschließende Signalkette gibt es weiter, um eine physiologische Antwort, wie z.B. die Aktivierung von Zielgenen, herbeizuführen. Die Zelle verfügt über spezielle Rückkopplungsmechanismen, um sich an ankommende Signale zu adaptieren und diese zu regulieren. Die im Nachfolgenden erläuterte TGF- β Superfamilie und besonders die BMPs sind maßgeblich in diese zellulären Prozesse, sowohl extra- als auch intrazellulär, involviert und sollen näher betrachtet werden.

2.2 TGF- β Superfamilie

Die Superfamilie stellt eine große Gruppe von strukturell verwandten Liganden dar. Sie ist in viele verschiedene zelluläre Mechanismen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Adhäsion, Motilität und Apoptose in nahezu allen Geweben involviert (Hogan 1996), (Massague und Chen 2000, Miyazono 2000). Sie umfasst mehr als 30 Proteine im Säugetier. Die BMPs repräsentieren die größte Subfamilie, aber auch GDFs (engl. growths and differentiation factors), Aktivin, Inhibin, GDNFs (engl. Glial cell-derived neurotrophic factor) und TGFs gehören dazu (Abbildung 1). Die Zytokine sind dimere Proteine in konservierter Struktur mit pleiotropen Funktionen in vitro und in vivo (Kawabata 1998) und werden von der Zelle in einer inaktiven Form sezerniert. Sie binden an spezifische Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und übermitteln über Smad-Proteine intrazelluläre Signale (Miyazono 2000).

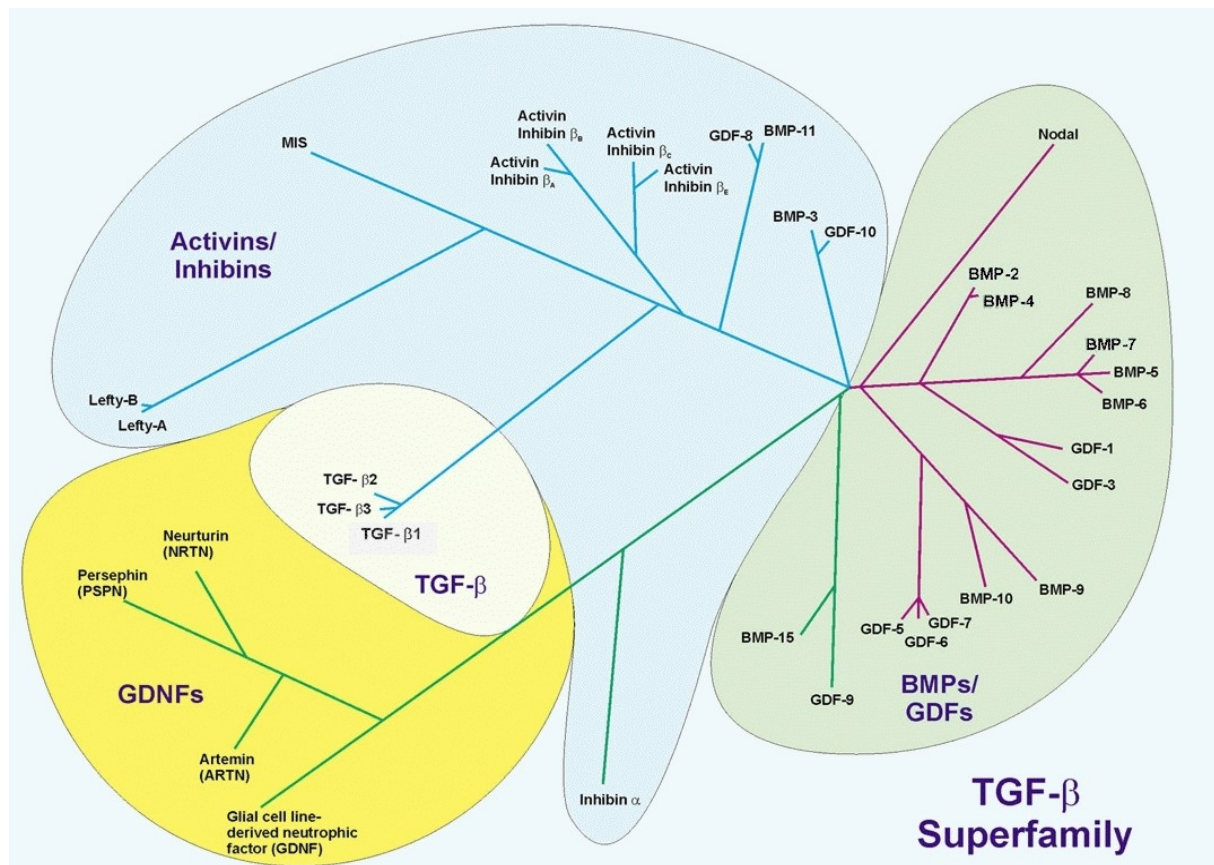


Abbildung 1: Mitglieder der TGF- β Superfamilie (Quelle: nach Frontiers in Bioscience 14, 4992-5012, June 1, 2009)

Smad-Proteine sind wichtige intrazelluläre Signalmoleküle, die über Serin/Threonin Rezeptoren sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken. Der zusammengesetzte Name SMAD leitet sich von genetischen Studien an *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* ab. Die Abkürzung MAD (= Mother against decapentaplegic) stammt vom *Drosophila*-Gen, SMA (=Smal body size) vom Gen in *Caenorhabditis elegans*.

Acht verschiedene Smad-Proteine sind im Säugetier beschrieben. Sie werden in drei Subklassen unterteilt, die rezeptorregulierten Smads (R-Smad), die common partner Smads (Co-Smad) und die inhibitorischen Smads (I-Smad). Die R-Smads können wiederum in die BMP aktivierten Smads (BR-Smad) und die Aktivin/ TGF- β aktivierten Smads (AR-Smad) unterteilt werden. Smad1/5 und 8 werden vom BMPRI, ALK-3 und ALK-6 aktiviert, Smad1 und 5 außerdem von ALK-1 und ALK-2 (Miyazawa et al. 2002). Smad2 und Smad3 als AR-Smads werden von Aktivin, Nodal, TGF- β Typ-I-Rezeptor und ALK-4 bis -7 aktiviert. Smad4

agiert als Co-Smad und wurde erstmals als Produkt des Tumorsuppressorgens DPC4 im Pankreaskarzinom isoliert (Hahn et al. 1996). Smad6 und Smad7 inhibieren die TGF- β induzierte Transkriptionsaktivität (Hayashi et al. 1997, Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997). Eine Übersicht dazu bietet Abbildung 2.

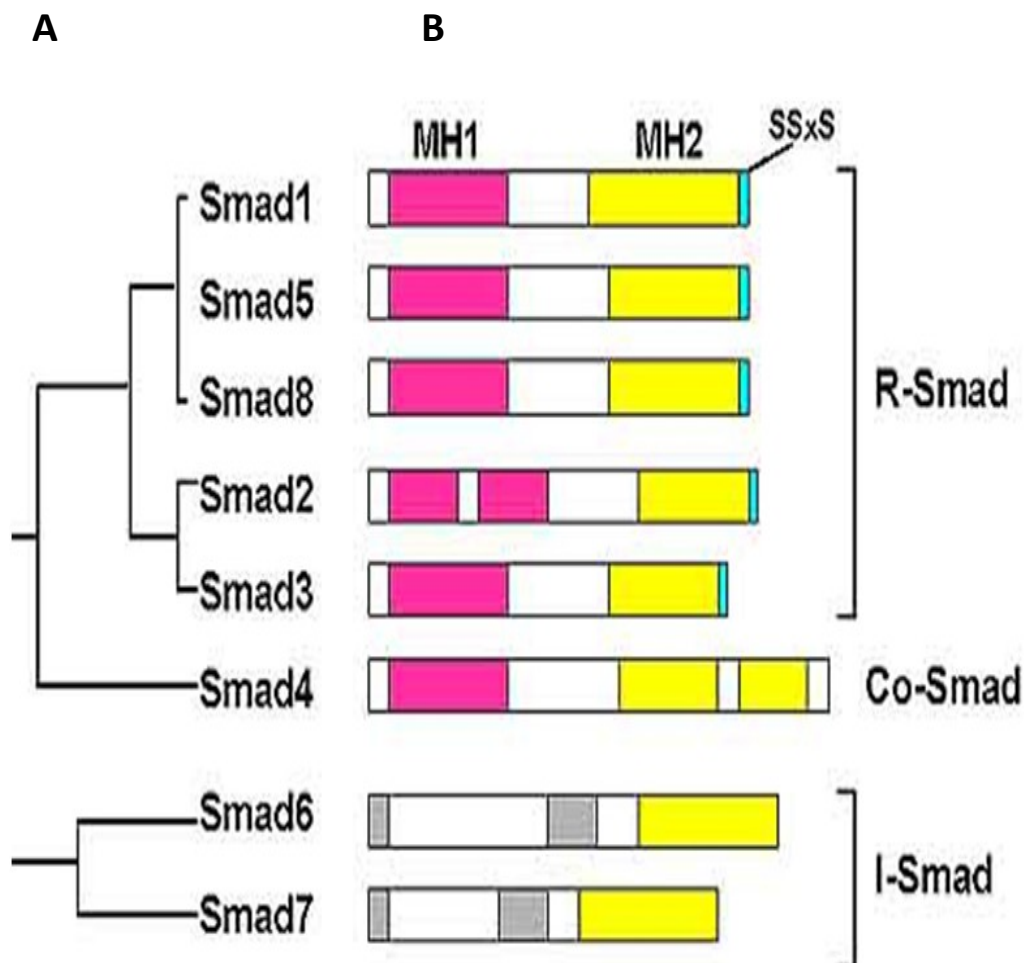


Abbildung 2: Phylogenetische (A) und schematische (B) Einteilung der Smad-Familie: Die Smad-Familie lässt sich in drei verschiedene Untergruppen gliedern. Smad1/5/8 und Smad2/3 gehören zu den R-Smads. Dem Co-Smad wird Smad4 zugeteilt. Smad6/7 bilden zusammen die I-Smads für die negative Rückkopplung. Die R-Smads enthalten spezifische Serinreste im SSxS Motif am C-terminalen Ende zur Phosphorylierung durch Typ-I-Rezeptor-Kinasen (modifiziert nach Nishimura et al. 2003).

Unabhängig vom Bindungsmodus phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor in einer intrazellulären Juxtamembran, der GS-Domäne, welche reich an Serin und Glycin ist. Dies löst die Phosphorylierung der rezeptorregulierten Smads (R-Smads), also Smad1/5/8 aus, die nur abhängig von einer Phosphorylierung von Typ-I-Rezeptoren angeschaltet wird

(Hoodless et al. 1996). Durch die Aktivierung interagieren die R-Smads mit Smad4. Es ist das einzige Co-Smad, welches sowohl von den BMPs als auch von TGF- β genutzt wird (Aoki et al. 2001). Der entstandene Komplex transloziert in den Zellkern (Lagna et al. 1996), bindet entweder direkt oder indirekt über DNA-bindende Proteine die DNA und reguliert über die Interaktion mit spezifischen Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen. Die MH-Domäne der Smads, eine intrinsische Signaldomäne mit einem hochkonservierten Bereich aus ca. 130 AS am N-terminalen Ende, bindet an Transkriptions-Co-Aktivatoren und -Co-Repressoren, die eine Acetylierung und Deacetylierung der Histone induzieren (Miyazono et al. 2000). Abbildung 3 stellt eine Zusammenfassung des Smad-Signalweges dar.

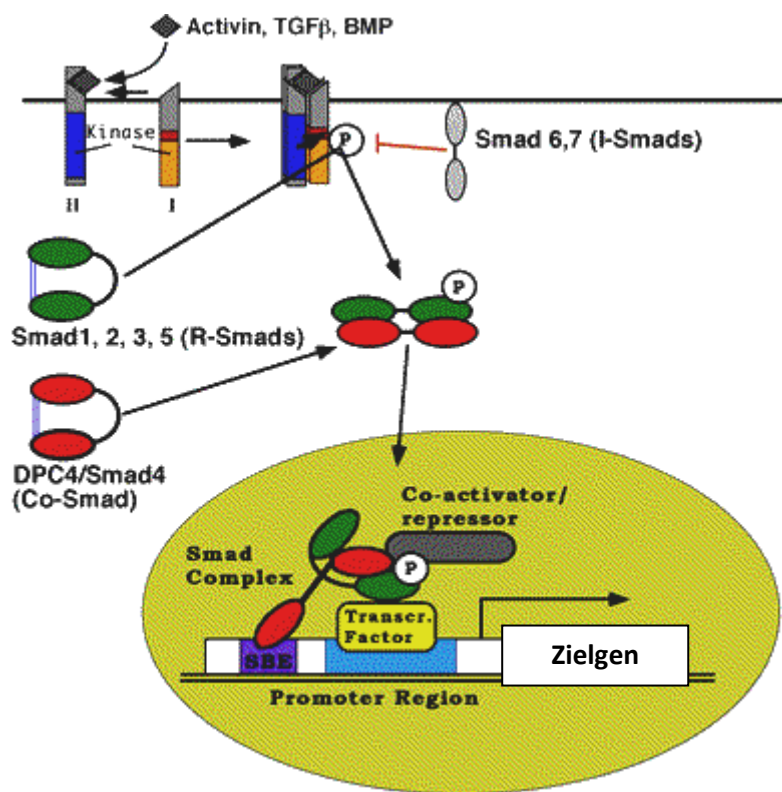


Abbildung 3: schematische Darstellung des Smad-Signalkaskade (nach Hahn et al. 1996)

Smad6 und Smad7 können den durch BMP aktivierten Smad-Signalweg prinzipiell inhibieren, wobei Smad6 spezifisch für den BMP-Signalweg ist (Heldin et al. 1997). Über die Rekrutierung von Ubiquitinligasen löst Smad6, analog dem Smad7 im TGF- β Signalweg, eine Rezeptordegradierung am aktivierten Typ-I-Rezeptor aus und inhibiert somit die Komplexbindung zwischen R-Smad und Co-Smad (Murakami et al. 2003). Pseudorezeptoren,

wie z.B. BAMBI, können den BMP-Liganden vor Bindung am Typ-II-Rezeptor abfangen und somit den BMP-Signalweg inhibieren (von Bubnoff und Cho 2001).

Neben den Smads können auch andere Signalkaskaden durch TGF- β aktiviert werden. Dazu zählen die Familie der MAP-Kinasen, die Rho-GTPasen und die PI3 Kinasen mit ihrem Effektor AKT. Zu den MAP-Kinasen gehören fünf Untergruppen im Säuger: ERK 1/2, JunK 1,2 und 3, die p38 mit ihren Untereinheiten α , β , γ und δ , ERK 3/4 und 5 (Chen et al. 2001). TGF- β kann ERK, JunK und p38-MAP-Kinase-Signalwege auslösen (Hanafusa et al. 1999). Die MAP-Kinase-Signalkaskade schließt drei weitere Kinasen ein, zu denen die MAP-Kinase, MAP-Kinase-Kinase und eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase gehören. Sie wird durch Stimuli wie zellulärer Stress, Wachstumsfaktoren wie die BMPs oder Zytokine ausgelöst. MAP-Kinase-Moleküle können BMP-Signale transduzieren oder als Inhibitoren fungieren (Nakamura et al. 1999).

Die MAP-Kinasen ERK1 und 2 teilen 85% Homologie und werden durch extrazelluläre Signale von Wachstumsfaktoren wie BMPs aber auch Hormonen und Phorbolestern aktiviert. In der physiologischen Zelle stimulieren die Wachstumsfaktoren die Aktivierung von Raf und Ras, welche die Phosphorylierung von ERK1 veranlassen, was wiederum die ERKs durch duale Phosphorylierung aktiviert. Sobald dieser Mechanismus ausgelöst wird, phosphorylieren die ERKs zytoplasmatische Zellsignalmoleküle, Oberflächenrezeptoren und Transkriptionsfaktoren im Nukleus. Durch spezielle „downstream“ Effektoren werden das Zellwachstum und die Differenzierung kontrolliert.

Die p38-MAP-Kinase reguliert als möglicher Tumorsuppressor mit oder ohne JNK-Beteiligung prädominant Entzündungs- und Stressantworten der Tumorzellen (Loesch und Chen 2008). Eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges erfolgt sowohl mit als auch ohne Smad-Proteine. Yu und Kollegen konnten aufgrund einer Mutation des TGF- β -Typ-I-Rezeptors T β RI Δ L45 im epithelialen Brustgewebe der Maus eine Smad unabhängige Kinaseaktivität nachweisen (Yu et al. 2002).

2.3 Modulation der Signalwege

Die Modulation und Modifikation der Signalwege erfolgt auf verschiedenen Ebenen. So kommt es sowohl im Extrazellularraum, auf der Liganden-Rezeptorebene und intrazellulär in der Signalkaskade zu Veränderungen der Zelle.

Als erster extrazellulärer Modulator der TGF- β Signalwege wurde Noggin beschrieben. Dieser Prototyp eines BMP-Bindungsproteins mit hoher Affinität wurde erstmals im *Xenopus* Embryo entdeckt (Smith und Harland 1992). Es handelt sich um ein 32kDa großes Glykoprotein, welches als Homodimer sezerniert wird. Noggin ist ein Antagonist für BMP-2, -4, -7, -14 und GDF-5 und blockiert als Dimer die Epitope auf den BMPs für beide Rezeptoren. Das Tumorwachstum wird gehemmt. Diese Eigenschaften zeigen möglicherweise einen zukünftigen Einsatz als adjuvantes Medikament in der Knochenmetastasen-Therapie (Schwaninger et al. 2007).

Weitere extrazelluläre Proteine, die durch Komplexbildung die Aktivität der BMPs inaktivieren, sind Chordin (Smith 1995), Follistatin (Yamashita et al. 1995), Gremlin und Dan (Hanaoka et al. 2000). Die BMP-Antagonisten sind maßgeblich an verschiedenen embryologischen Prozessen, wie der Entwicklung des dorso-ventralen Achsensystems, dem Gelenk- und Skelettsystems und der Ausdifferenzierung des neuronalen Systems beteiligt (Groppe et al. 2003). Chordin beispielsweise wird durch das Mesendoderm sezerniert und bindet spezifisch an die BMPs. Dadurch hemmt es deren Interaktion mit den BMP-Rezeptoren. Es ist u.a. wichtig für die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zur Entwicklung der pharyngealen Region (Bachiller et al. 2003).

Die zweite Möglichkeit, den Signalweg zu regulieren, bietet die Membranebene. Pseudorezeptoren wie BAMBI/NMA spielen dabei eine entscheidende Rolle. Dorsomorphin ist ein „Small-molecule“ Inhibitor der BMP-Typ-I-Rezeptoren ALK-2, ALK-3 und ALK-6. Es wurde erstmals in Zebrafischen entdeckt. Dort stört es die dorsoventrale Achsenformation. Es inhibiert in vivo selektiv die BMP-vermittelte Smad1/5/8-Phosphorylierung, die Zielgentranskription und die osteogene Differenzierung. Eine essentielle Rolle für hepatische BMP-Signale wird vermutet (Yu et al. 2008).

Intrazellulär interagiert Smurf1, eine Hect Domäne E3 Ubiquitinligase, mit Smad1 und 5 und schwächt die Smad-Proteine (Chen et al. 2004).

2.4 BMPs

Die bone morphogenetic proteins (BMPs) repräsentieren mit über 20 Mitgliedern die größte Subklasse der TGF- β -Superfamilie (Hogan 1996).

Sie sind multifunktionelle Regulatoren verschiedenster biologischer Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose sowohl im Säuger als auch in anderen Lebensformen. Der Name entstand aufgrund ihrer Fähigkeit der Osteoinduktion bei Versuchstieren (Urist et al. 1965). Genauere Untersuchungen und die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden führten später zur Isolierung und Identifikation der BMPs (Wozney et al. 1988, Luyten et al. 1989). Aufgrund ihrer Funktion und Struktur lassen sich die BMPs in drei Untergruppen unterteilen. Zur ersten Untergruppe BMP-2/-4 gehören BMP-2, BMP-4 und das Drosophila- Genprodukt „Drosophila decapantaplegic“ dpp. Die zweite Gruppe OP-1 wird aus BMP-5, -6, -7, -8 und dem Drosophila- Genprodukt gbb- 60A gebildet. Die dritte Gruppe setzt sich aus dem growth-and-differentiation Faktor-5 (GDF-5), GDF-6 und -7 und CDMP-1 zusammen (Kawabata et al. 1998).

Durch die Entdeckung der Proteine in den unterschiedlichsten Organismen entstanden mehrere Bezeichnungen für ein BMP. Für die in dieser Arbeit verwendeten BMPs zeigt die Tabelle die unterschiedliche Namensgebung.

Tabelle 1: Unterschiedliche Bezeichnungen für die einzelnen BMPs

Bone morphogenetic proteins	Bezeichnungen
BMP-2	BMP-2A, DPP
BMP-3	Osteogenin
BMP-6	DVR-6, Vgr-1, D13Wsu115e, 60A d
BMP-7	OP-1, 60A d

BMP-1 bildet eine Ausnahme und gehört nicht zur TGF- β -Familie. Die Metalloproteinase ist besonders an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt und spielt somit eine herausragende Rolle bei der Wundheilung und Organomorphogenese (Kessler et al. 1996).

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie zeigen alle einen sehr ähnlichen Aufbau, d.h. alle Präproproteine, bestehend aus 400 bis 450 AS, werden als Vorläuferproteine zuerst synthetisiert und das entstandene charakteristische Signalpeptid ermöglicht die Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum. Der nach Abspaltung gebildete dreidimensionale Cysteinknoten besteht aus sechs der sieben konservierten Cysteine. Ein Cysteinrest ist nicht im Knoten enthalten und bildet eine einzelne Disulfidbrücke zwischen zwei Untereinheiten.

Daraus entsteht ein kovalent gebundenes Dimer, welches als Homodimer für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Einige der BMPs, wie z.B. BMP-2, -4, -5, -6, -7 können Heterodimere mit größerer biologischer Aktivität bilden. BMP-2 und -4 sind sich mit 92% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz strukturell sehr ähnlich (Griffith et al. 1994), während BMP-2 in seiner Sequenz nur zu 60% identisch zu BMP-7 ist. BMP-5-, -6, -7, -8 sind mit über 85% strukturell Verwandte.

BMP-2, ein 32kDa großes Homodimer, wird als Proprotein mit 453 Aminosäuren synthetisiert. Nach Glykosilierung, proteolytischer Spaltung und Dimerisierung entsteht das mature Protein aus 114 C-terminalen Aminosäuren (Scheufler et al. 1999). Die Sekretion von Vesikeln in den Extrazellularraum ermöglicht die Entfaltung der BMP-Wirkung.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, kann die monomere Struktur der BMPs mit einer offenen Hand und zwei Fingern verglichen werden, wobei der Cystein-Knoten, der für die Stabilität verantwortlich ist, die Handfläche bildet, der α -Helix-Loop den Handballen und die vier Stränge eines antiparallelen β -Faltblatts die Finger (Daopin et al. 1992).

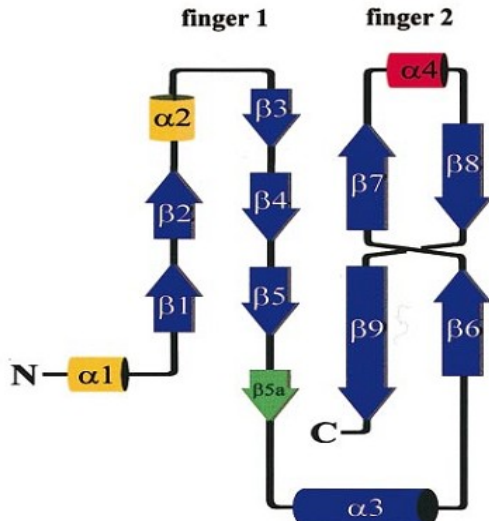


Abbildung 4: Sekundärstruktur des BMP-2 (nach(Scheufler et al. 1999)

Ihre biologische Aktivität entfalten die BMPs als extrazelluläre Signalmoleküle über Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Die BMP-Liganden binden an zwei membrangebundenen Rezeptoren, dem Typ-II- und Typ-I-Rezeptor. Beide Rezeptoren werden für die Signaltransduktion benötigt. Es gibt fünf Typ-II-Rezeptoren, bezeichnet als ActR-II, ActR-IIB, AMHR-II, BMPR-II und T β R-II, und sieben Typ-I-Rezeptoren, bezeichnet als Activin receptor-like-Kinase (ALK-) 1-7 (Miyazono 2000).

Der allgemeine Aufbau eines Rezeptors besteht in einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer membranübergreifenden Domäne und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase-Region (Kawabata et al. 1998, Massague et al. 1998). Die Typ-II-Rezeptor-Interaktion liegt begründet in einer hohen Kreuzreaktion zwischen den Liganden und dem Typ-I-Rezeptor. Bei Aktivin und TGF- β bindet zuerst der Ligand an den Typ-II-Rezeptor, die Serin/Threonin-Kinase-Domäne ist konstitutiv aktiv. Über einen aktiven tetrameren Komplex wird anschließend die GS-Domäne des Typ-I-Rezeptors transphosphoryliert. Die Ligandenspezifität wird durch den Typ-I-Rezeptor bestimmt.

Bei den BMPs erfolgt ein ähnlicher Mechanismus, bei dem die Bindungsreihenfolge entgegengesetzt zum Aktivin- und TGF- β Rezeptor funktioniert.

Zuerst bindet der BMP-Ligand den Typ-I-Rezeptor, wobei drei Typ-I-Rezeptoren BMP-Liganden binden können. Dazu zählen Typ-IA-, Typ-IB-BMP-Rezeptoren (BMPR-IA oder ALK-3 und BMPR-IB oder ALK-6) und Typ-IA-Aktivin-Rezeptoren (ActR-IA oder ALK-2) (Koenig, B.B. et al. 1994).

Es folgt die Zusammenlagerung mit dem Typ-I-Rezeptor. In der Folge kommt es zur Ausbildung eines Heterotetramerkomplexes. Auch hier wird der Typ-I-Rezeptor phosphoryliert und in der GS-Domäne gebunden, welche aus einer charakteristischen Sequenz von Glycin und Serin besteht. Die phosphorylierten Serinreste aktivieren eine intrinsische Kinase, die ausschlaggebend für die Signalweiterleitung ist (Wrana et al., 1994).

Da die Affinität der Liganden zum Rezeptor sehr variabel ist, ergeben sich unterschiedliche Kombinationen. Die folgende Tabelle soll dies verdeutlichen.

Tabelle 2: Beziehung zwischen Liganden, Rezeptoren und Smads in der TGF- β Superfamilie ((Shimasaki et al. 2004))

Ligand	Typ-II Rezeptor	Typ-I Rezeptor	Smad	Literatur
BMP-2	BMPR-II	ALK-3 (BMPR-IA)	Smad1/5/8	Yamaji et al. 1994
BMP-4		ALK-6 (BMPR-IB)		Rosenzweig et al. 1995
GDF-5	BMPR-II	ALK-3(BMPR-IA) ALK-6 (BMPR-IB)	Smad1/5/8	Nishito et al. 1996
	ActR-II			
	ActR-IIB			
BMP-6	BMPR-II	ALK-2 (ActR-IA) ALK-6 (BMPR-IB)	Smad1/5/8	Ebisawa et al. 1999
BMP-7	ActR-II			Macias- Silva et al. 1998
	ActR-IIB			
BMP-15	BMPR-II	ALK-6 (MPR-IB)	Smad1/5/8	Moore et al. 2003
GDF-9	BMPR-II	?	Smad2	Vitt et al. 2002
MIS/AMH	AMHR-II	ALK-2 (ActR-IA)	Smad2/3	Gouedard et al. 2000
		ALK-3 (BMPR-IA)		
		ALK-3 (BMPR-IB)		
Aktivin	ActR-II	ALK-4 (ActR-IB)	Smad2/3	Ten Dijke et al. 1994
	ActR-IIB			
TGF- β	T β R-II	ALK-1	Smad2/3	Lin et al. 1992
		ALK-5 (T β R-I)		

Die BMP-Ligandenantwort wird in verschiedenen Zelltypen und unterschiedlicher Kondition durch verschiedene Rezeptoren vermittelt. BMP-6 zeigt in Granulosazellen eine erhöhte Affinität zu Aktivin A, AKT-Rezeptor-I und -II (Glister et al. 2004). In adrenokortikalen Zellen agiert BMP-6 eher durch Aktivin Typ-II-Rezeptoren und ALK-2 und ALK-3 (Inagaki et al. 2006).

2.5 Biologische Aktivitäten der BMPs

Im Allgemeinen beschreibt schon der Name “bone morphogenetic proteins“ eine der zentralen Funktionen. Diese liegt in der Induktion des Knochen- und Knorpelwachstums (Rosen und Wozney 2002), in der Aufrechterhaltung des adulten Knochengleichgewichts und in der Knochenheilung. Besonders BMP-2, -6 und -9 zeigen ein erhöhtes osteogenes Potential durch Induktion von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (Cheng et al. 2003). BMP-3 gilt als Inhibitor der Osteogenese in vitro (Daluiski et al. 2001). Gleichzeitig wirkt es als Modulator der BMPs zur Aktivierung der Osteogenese in vivo (Bahamonde und Lyons 2001). BMPs werden darüber hinaus als potente Wachstumsfaktoren in der Therapie von Frakturen eingesetzt. Lokal verabreichtes rhBMP-2 und der Einsatz von rhBMP-2 beschichteten Implantaten zeigte eine verbesserte Frakturheilung im Bereich der Tibia (Schmidmaier et al. 2006). BMP-7 wird aufgrund seiner osteoinduktiven Wirkung zur Knochenbildung bei verzögerter Frakturheilung verwendet (den Boer et al. 2003), (Giannoudis und Tzioupis 2005).

In der Embryonalentwicklung spielen die BMPs eine weitere entscheidende Rolle. Besonders die Differenzierung mesenchymalen Gewebes, die Induktion des ventralen Mesoderms während der frühen Embryogenese und Interaktionen zwischen ekto- und mesodermalen Zellen gehören dazu. BMP-4 zählt zu den entscheidenden Regulatoren der frühen ventralen Entwicklung (Fainsod et al. 1997). Durch Antagonisierung der Wirkung von Noggin und Chordin fördert es die Ausbildung von Ekto- und Endoderm (Ferguson 1996), (Piccolo et al. 1996). BMPs werden in verschiedensten Geweben und Organen exprimiert. Einige BMPs, darunter BMP-2, BMP-4 und BMP-7, regulieren die konzentrationsabhängige Proliferation und Differenzierung von hepatopoetischem Gewebe (Bhatia et al. 1999). BMPs kontrollieren die Proliferation von Granulosazellen und Zelldifferenzierung im Ovar (Shimasaki et al. 2003). Während der frühen Zahnentwicklung werden besonders BMP-2 und -4 im dentalen Epithel exprimiert, was zur epithelialen Differenzierung der Zellen zu Ameloblasten und zur mesenchymalen Differenzierung der Odontoblasten führt (Thesleff et al. 1995), (Thesleff et al. 1996). BMP-6 ist ein Induktor der Interaktion zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen. Es stimuliert die Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten (Friedman et al. 2006). Auch an der Differenzierung von Keratinozyten ist BMP-6 maßgeblich beteiligt (Drozdoff et al. 1994). BMP-4 und BMP-7 spielen eine wesentliche Rolle bei der Ausdifferenzierung des Bronchialbaumes. In embryonalem Lungengewebe der Maus

konnten Bellusci und Kollegen nachweisen, dass eine ektope epitheliale BMP-4 Produktion der distalen Lungenknospen anstatt eines Bronchialsystems Bronchiektasien formierte (Bellusci et al. 1996). BMP-4 ist außerdem in hohem Maße an der proximal-distalen Zellentwicklung der Lunge beteiligt. Während eine starke Expression eher eine distale Differenzierung auslöst, kommt es bei geringem Signal eher zur proximalen Differenzierung (Weaver et al. 1999). BMP-7, ein aus 431 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (Ozkaynak et al. 1990), ist maßgeblich an der Augenentwicklung beteiligt und besitzt die Fähigkeit der Induktion von Smad1 (You und Kruse 2002). Auch in der Osteoblastendifferenzierung von mesenchymalem und pluripotenten Stammzellen ist es neben BMP-2 und BMP-6 beteiligt (Cheng et al. 2003).

Nach der Embryogenese besitzen die BMPs eine herausragende Rolle, um die körperlichen Funktionen aufrechtzuerhalten. BMP-2 stimuliert beispielsweise die Granulosa-zelldifferenzierung im Ovar und induziert die Östradiolproduktion (Souza et al. 2002). Weiterhin ist es an der Kardiomyozytenkontraktion maßgeblich beteiligt (Ghosh-Choudhury et al. 2003). BMP-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Monozytenadhäsion während einer Entzündungsreaktion (Sorescu et al. 2004). BMP-6 stimuliert die FSH-Sekretion zur Aufrechterhaltung der ovariellen Funktion (Huang et al. 2001). BMP-7 ist wichtig zur Epithelialisierung metanephritischen Mesenchyms in den Nieren und Tubenepithelialisierung. Es schützt den epithelialen Phenotypus, reguliert die Fibrogenese herunter und verringert die Inflammation.

2.6 BMPs im Tumorgeschehen

Neben der Embryogenese spielen die Knochenmorphogenesefaktoren eine besondere Rolle in der Tumorentstehung. Bisher konnte der Nachweis von BMPs u.a. in Tumoren der Lunge (Tada et al. 1998), (Langenfeld et al. 2003), des Magens (Katoh und Terada 1996), der Prostata (Bentley et al. 1992), (Harris et al. 1994), der Mamma (Clement et al. 1999), (Reinholz et al. 2002) und des Pankreas (Kleeff et al. 1999) erfolgen.

BMP-2 kann durch Aktivierung des BMP- und MAP-Kinase-Signalweges und durch die Phosphorylierung des ID-1 die Vaskularisierung in der Tumorangiogenese erhöhen (Raida et al. 2005). Weiterhin steigert eine erhöhte Expression von BMP-2 die

Mammakarzinomentstehung und löst einen aggressiveren Phenotyp mit östrogenunabhängigem Wachstum aus (Clement et al. 2005). Im Prostata- und Pankreaskarzinom ist es an der Regulierung der Proliferation beteiligt (Kleeff et al. 1999). Während der Knochenmorphogenesefaktor das Wachstum der Bronchialkarzinomzelllinie A549 stimuliert (Langenfeld et al. 2003), wirkt BMP-2 im Kolonkarzinom inhibierend (Beck et al. 2006).

Inaktiviertes BMP-3 spielt eine Rolle in der Entstehung und Progression des kolorektalen Karzinoms (Loh et al. 2008) und begünstigt die Progression des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (Dai et al. 2004).

Eine starke Expression von BMP-6 und gleichzeitige Herunterregulierung seiner Antagonisten nimmt Einfluss auf die Entstehung von Prostatakarzinomen und deren Metastasierung (Yuen et al. 2008).

BMP-7 verringert die Vaskularisierung von humanen Brustkrebszellen. In Mäusen konnte in vitro durch Überexpression von BMP-7 eine Verbesserung der Osteolyse gezeigt werden und die Fähigkeit zur Metastasenbildung gehemmt werden. BMP-7 könnte zur potentiellen Therapie von Knochenmetastasen eingesetzt werden (Buijs et al. 2007).

Eine Korrelation zwischen BMP-Expression und Tumorprognose konnte bislang aber nicht festgestellt werden.

2.7 Das Mammakarzinom im Zusammenhang mit den BMPs

Das Mammakarzinom stellt in Deutschland den häufigsten bösartigen Tumor der Frau dar. Die Inzidenz beträgt ca. 60.000 Neuerkrankungen/Jahr. Jede zehnte Frau erkrankt laut Robert-Koch-Institut im Laufe ihres Lebens an diesem Tumor, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 62 Jahren. Die Krebssterblichkeit unter den Malignomen beträgt 17,8%. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes verstarben im Jahr 2005 17455 Frauen. Vielseitige Prädispositionen sind reproduktive Einflüsse wie späte Erstparität (> 30. Lebensjahr), frühe Menarche (< 12. Lebensjahr), späte Menopause (>52. Lebensjahr), Nullipara. Des Weiteren scheinen der Hormonstatus, geringe körperliche Aktivität, Adipositas, hoher Alkoholkonsum und Zigarettenrauchen eine Rolle zu spielen, dies ist aber nicht weitreichend geklärt. Die

genetische Disposition liegt bei ca. 5-10% (Chang-Claude, 1997) und stellt somit nicht das Hauptrisiko dar. Histologisch wird das Karzinom in duktal, mit einem Anteil von 75%, lobulär, mit einem Anteil 15%, und in Mischformen wie nicht invasiv und invasiv wachsend eingeteilt. Es werden aber auch molekulargenetische, immunhistochemische und biochemische Kriterien erfasst, um Aussagen zu Prognose und Therapie treffen zu können.

Mit der Erforschung der BMPs und deren potentieller Einfluss auf das Tumorgeschehen in der Brust kann ein wichtiger Schritt in Richtung Aufklärung auf zellulärer Ebene getan werden und so eventuelle zukünftige Ansatzpunkte in der Therapie von Brustkrebs gefunden werden. Die Knochenmorphogenesefaktoren, insbesondere BMP-2 und BMP-4, spielen in der fötalen und postnatalen Entwicklung der Brustdrüse (Phippard et al. 1996), aber auch in der Zelldifferenzierung und Zellwachstum der Mamma eine entscheidende Rolle. Arnold und Kollegen entdeckten auf der Suche nach Proteinen, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs und der häufigen Metastasierung des Tumorgewebes stehen, die Expression von BMPs sowohl im Gesunden als auch im bösartig erkrankten Brustgewebe (Arnold et al. 1999). Eine verstärkte BMP-2-Expression führt zu Mikroverkalkungen des ipsi- als auch des kontralateralen Brustgewebes (Liu et al. 2008) und kann die Krebsentstehung begünstigen. BMP-2 kann einen aggressiveren Phenotyp des Tumors induzieren, wodurch ein hormonabhängiges oder -unabhängiges Wachstum der Mammakarzinomzelle begünstigt wird (Clement et al. 2005). Demgegenüber stehen Daten, die belegen, dass BMP-2 die östrogeninduzierte Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 hemmt (Ghosh-Choudhury et al. 2000).

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Aus den vorausgegangenen Erörterungen wurde ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen BMPs und der Tumorigenese im Allgemeinen und des Mammakarzinoms im Besonderen ersichtlich. Sowohl BMP-2, als auch BMP-6 und -7 zeigten induktive als auch inhibierende Effekte in der Tumorentstehung. Die Frage nach den Ursachen dieser Wirkung liegt nahe. Einflüsse wie die Konzentration und Expositionszeit sind denkbar und wurden bereits beschrieben (Clement et al. 2005), (Shimasaki et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte ein genaueres Verständnis der Komplexität intrazellulärer Signaltransduktion und Genexpression in der Karzinogenese erlangt werden. Dazu dienten verschiedene molekularbiologische Verfahren. Anhand der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 sollten verschiedene BMPs auf ihre zelluläre Wirkung beurteilt. Verschiedene Expositionszeiten und Konzentrationen der BMPs dienten der Prüfung auf die Beeinflussung der Zellphysiologie und der Tumorigenese. Mittels semiquantitativem Western Blot wurden die intrazellulären Signalproteine Smad, MAP-Kinase und AKT beurteilt. Ausgewählte Zielgene sollten mittels RT-PCR quantifiziert werden. Die multiparametrische Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie sollte etabliert und die direkte Bestimmung des BMP-Effektes an der vitalen Tumorzelle in vitro durchgeführt werden. Die Validierung des Verfahrens sollte mit Western-Blot-Untersuchungen geprüft werden.

3. Material

3.1 Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7

Die humane Zelllinie MCF-7 (ATCC, Manassas, USA) ist eine hormonsensitive, nicht invasive Mammakarzinomzelllinie, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit metastasiertem, duktalem Mammaadenokarzinom gewonnen wurde. Wegen der hohen Anzahl von Estrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren von 70-90 fmol/mg Protein wird sie als hormonsensitiv bezeichnet (Brooks et al. 1973). Sie wurde von der Firma Amersham Biosciences bezogen. Die Kultivierung erfolgte mit Dulbecco's modifiziertem Eagles Medium (DMEM)- High Glucose plus 10% fötalem Kälberserum (FCS).

3.2 Wachstumsfaktoren

Rh- BMP-2	(Stammlösung: 3833,79 nM)
Rh- BMP-3I	(Stammlösung: 2361,12 nM)
Rh- BMP-3S	(Stammlösung: 3986,45 nM)
Rh- BMP-3 Sm04	(Stammlösung: 7971,05 nM)
Rh- BMP-3 Sm05	(Stammlösung: 4001,15 nM)
Rh- BMP-6	(Stammlösung: 3191,93 nM)
Rh- BMP-7	(Stammlösung: 3173,15 nM)
Rh- ALK-3 ECD	(Stammlösung: 6825,75 nM)
Rh- Noggin	(Stammlösung: 2091,18 nM)

3.3 Kommerzielle Kits

RNesy- Kit	[Qiagen, Hilden]
LightCycler R 480 SYBR Green 1 Master 04887352001	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]
LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green 1	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]

ECL Western blotting detection reagents and analysis system [Amerham, Freiburg]

3.4 Zubehör

Zellkulturflaschen [Cellstar®, Greiner bio-one, Frickenhausen]

Gewebekulturplatten (96 Well, flach) [Cellstar®, Greiner bio-one, Frickenhausen]

3.5 Antikörper

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Quelle</u>
Goat anti- Aktin (sc-1616), polyclonal	1:500	[Santa Cruz, Santa Cruz-USA]
Rabbit anti- pSmad1/5/8 (#9511), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- Smad1 (#9512), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- pp38 (#9211S), polyclonal	1:500	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- p38 (#9212), polyclonal	1:500	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- pAKT (#9271S), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- AKT (#9272), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- pp44/42 (#9101S), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
Rabbit anti- p44/42 (#9102), polyclonal	1:1000	[Cell Signaling, Danvers-USA]
<u>Sekundäre Antikörper</u>		
Goat- anti- Rabbit IgG- HRP (sc-2030)	1:2000	[Santa Cruz, Santa Cruz-USA]
Donkey- anti- Goat IgG- HRP (sc- 2033)	1:2000	[Santa Cruz, Santa Cruz-USA]

Alexa Fluor® 647-Mouse anti-p38-MAP-Kinase

(pT180/pY182)

[Biosciences Pharmingen, San Diego-USA]

Alexa Fluor® 488-Mouse anti-ERK1/2-MAP-Kinase

(pT202/pY204)

[Biosciences Pharmingen, San Diego-USA]

3.6 Puffer

XT-MES Running Puffer 20x	[Bio-Rad, München]
XT-Sample Puffer 4x	[Bio-Rad, München]
Transferpuffer	25mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20% v/v Methanol; 0,05% v/v SDS
Laufpuffer	5% 20x XT-MES; 95% Milli-Q-Wasser
10x TBS-Puffer	200mM Tris-Base; 1,37M NaCl; Milli-Q- Wasser; pH 7,6
TBS-T Waschpuffer	10% v/v 10x TBS; Milli-Q-Wasser; 0,02% v/v Tween 20
Blocking Puffer	10% v/v 10x TBS; 5% w/v BSA; Milli-Q- Wasser; 0,02% Tween 20
Stripping Puffer	50 mM 2- Mercapto- Ethanol; 2% v/v SDS;62, 5ml Tris- HCl (pH 6,7; 1M); Milli-Q-Wasser
Lysepuffer RNA-Isolierung	RLT- Puffer aus Kit, 1% v/v 2-Mercaptoethanol
Lysepuffer Proteinisolierung	150 mM NaCl; 20 mM HEPES (pH 7,5); 10 mM EDTA (pH 8,1); 2 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ; 50 mM NaF; 2 mM Na ₃ VO ₄ ; 10% Triton X100; Milli-Q- Wasser; 1µM Pepstatin; 10µg/ml Aprotinin; 10µM Leupeptin; 500µg/ml Pefa Bloc
5x- Reaktionspuffer	250mM Tris-HCl, pH 8,3; 375nM KCl; 15ml MgCl ₂ [Bio-Rad,München]
10x PCR-Reaktionspuffer	[Qiagen, Hilden]
Phosflow Fix Puffer I	[Biosciences Pharmingen, San Diego-USA]

3.7 weitere Reagenzien

PBS	[Gibco-BRL, Eggenstein]
SDS	[Sigma, Steinheim]
TRIS- HCL 1M pH 6,8	
Criterion XT Precast Gel 10% Bis- Tris	[Bio-Rad; München]
Precision Plus Protein™ Kaleidoskop™ Standard	[Bio-Rad; München]
Crus- Marker™ MW Standards (sc-2035)	[Santa Cruz, USA]
Ampuwa®- Wasser	[Fresenius Kabi]
Immunu Blot PVDF- Membran	[Bio-Rad; München]
Blot Paper Criterion™ Size	[Bio-Rad; München]
Hyperfilm	[Bio-Rad; München]
Albumine from bovine serum, min. 98%	[Sigma, Steinheim]
Tris- Base	[Sigma, Steinheim]
Glycin	[Roth, Karlsruhe]
2- Mercaptoethanol	[Sigma, Steinheim]
Methanol	[Roth, Kalsruhe]
Trypsin- EDTA	[Gibco-BRL, Eggenstein]
DMEM+ Glutamax™-I	[Gibco-BRL, Eggenstein]
HEPES	[Sigma, Steinheim]
Tween 20	[Sigma, Steinheim]
Triton X- 100	[Sigma, Steinheim]
RNasin (40U)	[Invitrogen, Paisley-UK]
Random Primer (3,0µg/µl)	[Invitrogen, Paisley-UK]
DTT (Dithiothreitol)	[Invitrogen, Paisley-UK]
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	[Invitrogen, Paisley-UK]
M-MLV reverse Transkriptase	[Invitrogen, Paisley-UK]
Oligo (dT)- Primer (320µM)(40µg/8µmol)	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]

5x Q- Solution für PCR- Ansatz	[Qiagen, Hilden]
Aprotinin	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]
Leupeptin	[Boehringer, Mannheim]
Pepstatin	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]
Pefa- Bloc	[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]
Bradford- Reagenz	[Sigma, Steinheim]
EDTA	[Sigma, Steinheim]
EGTA	[Sigma, Steinheim]
NaCl	[Roth, Karlsruhe]
Na ₂ - EDTA	[Sigma, Steinheim]
NaF	[Sigma, Steinheim]
Na ₄ P ₂ O ₇	[Sigma, Steinheim]
Na ₃ VO ₄	[Sigma, Steinheim]
Reducing Agent	[Bio-Rad, München]

3.8 Geräte

Brutschrank	[TypBB 6220, Heraeus Instruments, Osterode]
Sterilbank	[TypHS 12/2, Heraeus Instruments, Osterode]
Zentrifugen	[Eppendorf 5417C, Eppendorf 5810R, Eppendorf AG, Hamburg]
Megafuge	[Heraeus Instruments, Osterode]
Zellzählgerät	[Typ Z2, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld]
UV- Spektrometer	[ND-1000, Nano Drop Technologies, USA]
LightCycler 1,5	[Roche Diagnostics, Mannheim]

Powergeräte	[Power Pac 200, Bio-Rad, München]
	[Power Pac HC™, Bio-Rad, München]
Blotapparatur	[Trans Blot®, Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München]
LAS 1000	[Fujifilm, Düsseldorf]
LAS 3000	[Fujifilm, Düsseldorf]
Spektrophotometer	[Pharmacia Biotech GmbH, Freyburg]
FACS-Calibur	[Becton-Dickinson, Heidelberg]

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Um eine Kontaminationen mit Mikroorganismen und somit größtmögliche Sterilität in zellbiologischen Experimenten zu gewährleisten, wurden alle Arbeiten unter der sterilen Werkbank durchgeführt und verwendete Geräte, Lösungen und Chemikalien vor Arbeitsbeginn desinfiziert bzw. autoklaviert.

4.1.1. Die Zelllinie MCF-7

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde von American Type Culture Collection bezogen (ATCC, Manassas, USA). Die Kultivierung erfolgte mit DMEM und 10% FCS =fötale Kälberserum.

4.1.2. Zellkultivierung

Zur Kultivierung wurden die Zellen im ca. 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 1ml/min DMEM 10% FCS versetzt, bis ein Volumen von 10ml entstand. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000U/min für 5min zentrifugiert, der Überstand danach verworfen. Mit der Zugabe von 7ml DMEM 10% FCS zum Zellpellet konnte nun die Suspension in eine 25cm²-Zellkulturflasche überführt werden, welche im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C über Nacht inkubierte. Am nächsten Tag erfolgte die Beurteilung des Zellrasens unter dem Mikroskop, um die Zelldichte, aber auch eine eventuelle Kontamination mit Mikroorganismen auszuschließen. Bei mindestens 80%iger Konfluenz der Zellen wurde nun das Medium verworfen und die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen. Die Zugabe von 2-3ml Trypsin für 2-3min bewirkte das Ablösen der adhären wachsenden MCF-7-Zellen von der Oberfläche. Das Trypsin wurde anschließend durch die im Zellkulturmedium enthaltenen Proteinaseinhibitoren inaktiviert. Ein Teil der Zellsuspension

wurde abhängig vom Wachstum in neue Kulturfläschchen gegeben und mit neuem Medium versetzt.

4.1.3. Zellaussaat

Um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden für alle Versuche 10^6 -Zellen MCF-7 verwendet. Des Weiteren war die genaue Zellzahlbestimmung mittels Beckmann Coulter Z1 notwendig. Dazu wurde eine 75cm^2 große Zellkulturflasche mit 3ml Trypsin versetzt. Nach Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurden 5-10ml Medium plus FCS 10% zugesetzt, das Gemisch daraufhin für 5min mit 1000U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte mit 3-5ml Medium. 50 μl davon wurden in 20ml Isoton II gegeben und im Coulter gemessen. Die Formel zur Berechnung des Volumens lautet:

$$V_z = V_s (C_s / C_z - 1)$$

V_z = Zusatzvolumen

V_s = Suspensionsvolumen

C_s = Zellkonzentration (ml-1)

C_z = benötigte Zellkonzentration (ml-1)

Mit einer Pipette der Firma Eppendorf wurden 1×10^6 Zellen in eine 25cm^2 Zellkulturflasche pipettiert. Die anschließende Inkubation im serumhaltigen Medium erfolgte im Brutschrank über Nacht.

4.1.4. Inkubationsversuche

Für die Proteinisolierung und die RNA-Isolierung wurde 1×10^6 Zellen pro 25cm^2 Flasche verwendet, für die intrazelluläre Messung mittels FACS 3×10^6 Zellen pro 75cm^2 Flasche. Nach der Inkubation mit serumhaltigem Medium wurden die Zellen 3mal mit D-PBS gewaschen, um sicher zu gehen, dass keine Restbestände vom serumhaltigen Medium vorhanden sind, und daraufhin für 12h mit 5-7ml serumfreien DMEM, also ohne FCS, versetzt, um einen „Hungerzustand“ der Zellen zu erreichen. Die anschließende Inkubation mit einer Dauer von

4h und 8h sowohl bei der Proteinisolierung als auch bei der RNA-Isolierung erfolgte mit rekombinantem humanen BMP-2 (rh-BMP-2), rekombinantem humanen BMP-3, rekombinantem humanen BMP-6, rekombinantem humanen BMP-7, Noggin, ALK-3 und einem Gemisch im Verhältnis 1:1 aus ALK-3 und rh-BMP-2. Je zwei 25cm² Kulturflaschen pro Inkubationsdauer wurden mit einer 100nM Stammlösung BMP-2, BMP-3, BMP-6, BMP-7, Noggin, ALK-3, Mix aus ALK-3 und BMP-2 und serumfreiem Medium angefertigt, zwei weitere zur Kontrolle mit serumfreiem Medium ohne BMPs inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die Inkubationszeiten 30min und 4h gewählt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus der Zellkultur erfolgte durch Verwendung des RNeasy Total Kit (Qiagen, Hilden). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es konnte bis zu 100µg Gesamt-RNA mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden isoliert werden. Dazu wurden die Zellen enthaltenden Flaschen nach der 4 und 8stündigen Inkubationszeit aus dem Brutschrank genommen, das Medium verworfen und die Zellen zunächst 3mal mit D-PBS gewaschen. Die Zugabe von 400µl Zellysepuffer RLT ermöglichte das Ablösen der Zellen und Auftrennen der Zellmembran, wobei außerdem ein Zellschaber zu Hilfe genommen wurde. Anschließend wurde die Probe in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und 24h bei -80°C aufbewahrt, um die denaturierende Wirkung des Guanidinisothiocyanats zur Inaktivierung der RNasen im RLT-Lysepuffer zu verstärken und die Effektivität im Allgemeinen zu erhöhen. Die entstandene inhomogene, visköse Masse mit der enthaltenen genomischen DNA wurde durch wiederholtes resuspendierendes Pipettieren homogenisiert und folgend auf den Spin-Filter D überführt. Durch die Zentrifugation für 2min bei 12000U/min konnten entstandene Zelltrümmer entfernt werden. Die Zugabe von 400µl 70% Alkohol zum Filtrat und mehrfaches Pipettieren ermöglichten die Aufhebung der Phasentrennung und zusammen mit dem Guanidinisothiocyanat die selektive Bindung der RNA. Die vollständige Mischung wurde auf ein Spin Filter R mit Silikagel gegeben und bei 12000U/min zentrifugiert. Diese Silikagel-beschichtete Membran ermöglicht die reversible Bindung von Nukleinsäuren durch hohe Konzentrationen chaotroper Salze. Um verbleibende

Zellbestandteile auszuwaschen, sind 500µl Waschlösung HS und 700µl Waschlösung LS mit zwischenzeitlicher Zentrifugation von 1min bei 10000U/min nötig. Um die weitere Eluierung nicht zu behindern, wurde nochmals 3min bei 10000U/min zentrifugiert. Die entstandene RNA wurde wiederum für 1min mit RNase-freiem Wasser inkubiert und von der Silikagel-beschichteten Membran durch eine einminütige Zentrifugation bei 10000U/min abgetrennt. Die entstandene RNA-Lösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und konnte entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -80°C eingefroren werden.

4.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Um die gleiche Menge an RNA zur cDNA-Synthese zu gewährleisten, wurde die Konzentration der isolierten RNA am NanoDrop-1000 photometrisch bestimmt. Basierend auf dem aromatischen Ringsystem der Basen in den Nukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260nm, bei den Proteinen liegt es aufgrund der aromatischen Aminosäurereste bei 280nm. Das Spektrum zur Messung der RNA-Proben ist bei 220- 350 nm zu finden. Um auch die Reinheit der RNA zu bestimmen, wird der Quotient aus 260/280 nm und 260/230nm ermittelt, welcher im besten Falle einen Wert um 2,0 ergibt. Die Konzentration wird mit dem Absorptionswert von 260nm ermittelt. Die Messsonde des NanoDrop wird mit 1µl RNA bestückt und gemessen, anschließend in µg/µl angegeben. Über das Lambert Beer'sche Gesetz errechnet sich die RNA-Konzentration:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

A= Absorption

ϵ = elementspezifischer Extinktionskoeffizient in m²/mol

c= Konzentration der Lösung in mol/m³

d= Schichtdicke der durchstrahlten Probe

4.2.3. cDNA-Synthese

Zur Synthetisierung der sogenannten complementary DNA (cDNA) wird das Prinzip der Umwandlung von RNA in cDNA mittels reverser Transkription genutzt. Hierzu wird das

Enzym reverse Transkriptase aus dem Moloney Leukaemia Virus als RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, welche gezielt die mRNA in cDNA umschreibt. Weiterhin wird ein Oligo-dT-Primer eingesetzt, der die mRNA über Erkennung eines spezifischen 3'-Poly-Adenosins in cDNA transkribiert. Der Random-Hexamerprimer, welcher aus einem Gemisch unterschiedlicher Sequenzen an Hexanukleotiden besteht, synthetisiert verschiedene cDNA-Moleküle. Dieser besitzt die größte Aktivität bei 37°C. Abschließend wird ein Enzym RNase OUT zugesetzt, welches die RNA vor dem Abbau schützt.

Pro Ansatz cDNA wurde 1µl isolierte RNA auf ein Gesamtvolumen von 8,5µl mit RNase freiem Wasser verdünnt und das Ganze bei 65°C für 5min inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu verringern. Der verwendete Synthese-Mix wurde wie folgt hergestellt:

4µl	5xM-MLV-Reaktionspuffer
2µl	Dithiothreitol (DTT) (0,1M)
1µl	Oligo-(dT) -Primer (0,2mg/ml)
1µl	Random-Hexamerprimer (0,2mg/ml)
1µl	dNTP-Mix (je 2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5µl	RNaseOUT-Ribonuklease (40U/µl)
1µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200U/µl)

Die inkubierte RNA wurde nun mit 11,5µl Synthese-Mix versetzt. Eine Inkubation von 10min bei Raumtemperatur und anschließender 60 minütiger Inkubation bei 37°C für die eigentliche reverse Transkription folgten. Am Ende wurde die reverse Transkriptase bei 95°C 8min lang inaktiviert und die entstandene cDNA bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

4.2.4. Quantitative RT-PCR am LightCycler

Die quantitative Real Time PCR ist ein inzwischen etabliertes und schnelles Verfahren, um Proben auf die Häufigkeit des Vorkommens einer bestimmten DNA-Sequenz hin zu

untersuchen. Hierbei werden durch gezielt hergestellte Primer genau definierte Nukleinsäureabschnitte amplifiziert und nach jedem Zyklus in Echtzeit dargestellt. Die oben erläuterte c-DNA Synthese mittels reverser Transkriptase stellt eine obligatorische Vorarbeit dar, da das Enzym *Taq*-Polymerase, welches für den Erfolg der PCR verantwortlich ist, ausschließlich DNA als Matritze verwendet.

Durch allmähliche Temperaturerhöhung auf 95°C wird die DNA aufgeschmolzen (=Denaturierung), was der Auftrennung des Doppelstrangs entspricht. An die Einzelstränge werden während des sog. Annealings, der sog. Anlagerungstemperatur (um 60°C), spezifisch Sense- und Antisense-Primer gebunden. In der Elongationsphase, bei der die Temperatur auf 72°C ansteigt, werden die Primer durch die *Taq*-Polymerase, die nun ihr Aktivitätsoptimum erreicht, in 5'-3' Richtung verlängert. Es kommt zur Anlagerung der komplementären dNTP, Synthese der gewünschten Zielsequenz und Bildung einer doppelsträngigen DNA.

β -Aktin, ein etabliertes Housekeeping-Gene, ist wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts und wurde in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle verwendet, um den Erfolg der RNA-Gewinnung und cDNA Synthese zu beurteilen, bevor die Proben der RT-PCR-Analyse unterzogen wurden.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green® aus dem Kit „Light Cycler® Fast Start DNA MasterPlus Kit SYBR-Green®I“ wird die DNA sequenzunspezifisch gebunden. Es entsteht somit eine direkte Korrelation der Fluoreszenzintensität mit der Menge des amplifizierten Genabschnitts. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen. Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen, wobei die Fluoreszenz aus dem Hintergrund hervortritt, kommt es zum Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes (CT-Wert= Threshold-Cycle), der abhängig von der Zahl der Ausgangskopien ist. Es schließt sich ein exponentieller Anstieg als Zeichen der Fluoreszenzintensität und als Ausdruck der Zunahme der entsprechenden DNA-Menge an, der in einer Plateauphase endet.

Mittels der sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse kann die Fragmentlänge und die daraus resultierende Identifikation der PCR-Produkte ermittelt werden. Durch bekannte Standardkonzentrationen kann eine Regressionskurve erstellt werden, womit die Konzentration in der untersuchten Probe bestimmt werden kann.

Zur Probenherstellung wurde eine 96-well Platte benötigt, die auf einem speziellen Kühlblock von 4°C gesetzt wurde. Je 1µl Probenmaterial bzw. 1µl β-Aktin als Standard wurde in ein Well pipettiert. Dazu kamen je 19µl Mastermix. Dieser bestand aus:

- 1µl Primergemisch (sense und antisense im Verhältnis 1:1)
- 10µl SYBR Green Mastermix ready-to-use
- 8µl PCR- grade Wasser

Mit Hilfe von Cap-Strips wurde die Well-Platte verschlossen, gevortext und kurz abzentrifugiert, alles im Mastercycler®ep realplex plaziert und mit dem entsprechenden Programm gestartet. In der zugehörigen Software konnten vorher die Parameter wie Temperatur, Annealing, Elongation und Zyklusanzahl variiert werden.

4.2.4.1. Primersequenzen für die RT-PCR-Analyse

Gen	Sense	Antisense
β-Aktin	5' CGG GAA ATC GTC CGT GAC AT 3'	5' GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC 3'
BMP-2	5' TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA CAT CG 3'	5' GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC 3'
BMP-3	5' CCC AAG TCC TTT GAT GCC TA 3'	5' TCT GCA AGC GCA AGA CTC TA 3'
BMP-6	5'GTC GTA ATC GCT CTA CCC AGT CC 3'	5' CTG GGT AAT AAG GCA CTG GCA TG 3'
BMP-7	5' CCT ACC CCT ACA AGG CCG TCT TC 3'	5' TGC TCC CCG TGG ACC GGA TGC TG 3'
Noggin	5' GGA CGC GGG ACG AAG CAG CAG 3'	5' AGG ATC AAG TGT CCG GGT GC
ID-1	5' AAC CGC AAG GTG AGC AAG GTG G 3'	5' ACG CAT GCC TCG GC 3'
SKY	5' GGT GGA CAT TGC CTG CGG CAT GGA 3'	5' CCC AAG ATG TTC TCC AGT TCC ATT CGC A 3'

Die grafische Auswertung der Messergebnisse am LightCycler machte eine Darstellung des PCR-Produktes im Agarose-Gel überflüssig.

4.3 Western Blot zur Proteinbestimmung

Der Western Blot stellt eine semiquantitative Methode zur Proteinbestimmung dar, bei der zuerst eine definierte Menge an Protein-Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen wird, wodurch die unterschiedlich großen Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden und zweitens die Proteine durch das eigentliche „Blotten“ auf eine PVCF-Nitrozellulosemembran übertragen werden. Anschließend wird die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert und die einzelnen Proteine identifiziert.

4.3.1. Proteinisolierung aus der Zellkultur und Konzentrationsbestimmung

Die verwendeten MCF-7 Zellen wurden nach ihrer 4 bzw. 8ständigen Inkubation mit den verschiedenen BMPs und der dazugehörigen serumfreien Kontrolle bei 37°C mit D-PBS gewaschen, anschließend auf Eis gelegt und mit einem zuvor speziell hergestellten Proteinlysepuffer versetzt:

0,2M	HEPES, pH 7,5
1M	NaCl
0,1M	EDTA, pH 8,0
0,1M	EGTA, pH 8,0
10%	Triton-X 100
0,1M	Na ₄ P ₂ O ₇
0,5M	NaF
0,1M	Na ₃ VO ₄ , vor Zugabe auf 95°C erhitzt
10mg/ml	Aprotinin, in 0,01M HEPES gelöst
0,01M	Pepstatin, in Methanol gelöst
0,1M	Leupeptin, in Wasser gelöst
50mg/ml	PefaBloc in Wasser gelöst

Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers D-PBS erfolgte die Zugabe von 200µl kaltem Proteinlysepuffer auf jede Probe. Eine kurze Einwirkzeit ermöglichte eine optimale Lösung der Zellen vom Flaschenboden durch spezielle Zellschaber. Das entstandene inhomogene Lysat wurde durch Pipettieren resuspendiert, in 100µl Portionen aufgeteilt und in entsprechend beschriftete Eppendorf-Reagenzgefäße überführt, die wiederum über Nacht bei -80°C gelagert wurden, um nahezu alle Zellen zu lysieren und die gesamte Proteinmenge zu erhalten.

Für weiterführende Untersuchungen wurden die Proben aufgetaut und bei 4°C für 15min bei 14000U/min herunterzentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand mit dem zu untersuchenden Protein wurde nun in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt.

4.3.2. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mittels der sogenannten Bradford-Methode (Bradford et al. 1976) bestimmt, welche auf Wechselwirkungen zwischen Protein und dem zugegebenen Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau beruht und photometrisch bestimmt wird. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs liegt bei 595nm. Das verwendete Spektro-Photometer (Pharmacia LKB Ultraspec III) wurde zuerst mit einem Standardgemisch aus Aqua destillata und Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:1 geeicht. Anschließend wurden 2µl Probe in 498µl Aqua destillata gegeben, mit 500µl Bradford-Reagenz versetzt und in Dunkelheit für 5-10 min inkubiert. Anhand der Standardkurve, die für Rinderalbumin definierter Konzentrationen erstellt wurde, konnte nun die Konzentration der Proteine in der Lösung bestimmt werden.

4.3.3. Auftrennung der Proteine durch SDS-Gel-Elektrophorese

Durch die Gel-Elektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um eine einheitliche Struktur der Proteine zu erhalten, wurde SDS (Natriumdodecylsulfat) als anionisches Detergenz der Proteineigenladung zugesetzt. Durch die anschließende 5minütige Erhitzung auf 95°C wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Zur Spaltung von Disulfidbrücken wurde β-Mercaptoethanol eingesetzt. 30µl

Proteinprobe, welche 50ng Proteinprobe und Proteinladepuffer im Verhältnis 4:1 beinhaltet, wurden nun auf das 12% Polyacrylamid- Gel mit sehr kleiner Porengröße aufgetragen. 6-10µl Rainbow-Marker und 6-10µl Santa Cruz Marker dienten zur Molekulargewichtsbestimmung. Zusammen mit einem speziellen Laufpuffer aus 20x XT-Runningpuffer und Aqua destillata erfolgte die Elektrophorese 75 min mit konstant 145V und 0,3A. Die Wanderung der negativ geladenen Proteine erfolgte von der Kathode zur Anode, wobei Proteine mit geringerem Gewicht näher an die Kathode gelangten.

4.3.4. Elektrotransfer- Blotten

Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurde das Gel behutsam abgelöst und in Aqua gewaschen, um eventuelle Laufpufferrückstände zu beseitigen. Danach wurde das Gel für ca. 20min und die benötigte Anzahl Filterpapiere für ca. 5min mit Transferpuffer (25mM Tris-Base, 192mM Glycin, 20%v/v Methanol, 0,05%v/v SDS 20%) benetzt. Die PVDF-Membran wurde zusätzlich ca. 1min in Methanol gelegt und aktiviert, anschließend auch für 5min mit Transferpuffer behandelt. Nun wurden analog der Abbildung 5 zuerst die 2 Filterpapiere, dann die PVDF-Membran, dann das Gel und abschließend wieder 2 Filterpapiere auf die „Semi-Dry“- Blot-Apparatur gelegt. Innerhalb 90min bei einer Stromstärke von 25V und einer konstanten Spannung von 0,09A konnten so die zwei Plattenelektroden den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran ermöglichen.

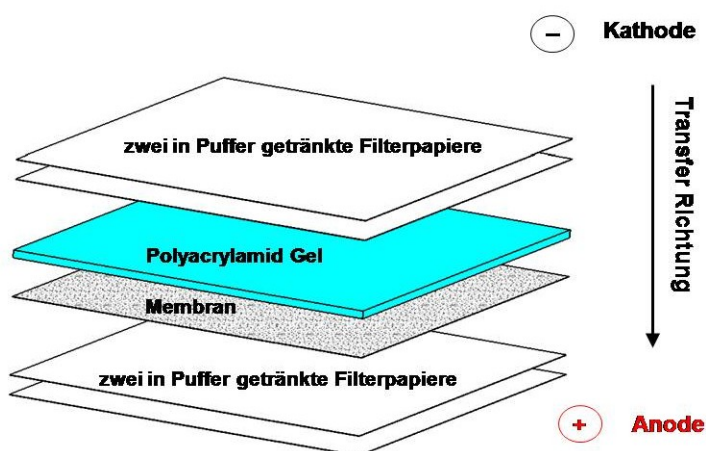


Abbildung 5: Western-Blot-Anordnung (Quelle: nach www.fermentas.com/templates/file)

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran mit Aqua destillata gewaschen und anschließend 1h lang mit BSA 4% (4% Rinderserum-Albumin in TBS-T) geblockt, um die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine zu besetzen. Mittels einer TBS-T-Waschlösung wurde die Membran anschließend 3x10min mit Aqua destillata gewaschen und danach über Nacht mit dem phosphorylierten primären Antikörper unter Bewegung inkubiert.

Tabelle 4: Zur Inkubation genutzte primäre und sekundäre Antikörper

Protein	Primärer Antikörper			Sekundärer Antikörper		
	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
pSmad1/5/8	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
Smad1	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
pAKT-MAP-Kinase	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
AKT-MAP-Kinase	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
pp38-MAP-Kinase	Rabbit	1:500	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
p38-MAP-Kinase	Rabbit	1:500	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
pERK1/2-MAP-Kinase	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
ERK1/2-MAP-Kinase	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	Goat- anti-rabbit	1:2000	Santa Cruz
β-Aktin	Goat	1:1000	Santa Cruz	Donkey- anti-goat	1:2000	Santa Cruz

Am nächsten Tag erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit Aqua destillata und die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper bei

Raumtemperatur (Tabelle 4) unter Schütteln, welcher sich speziell gegen die primären Antikörper richtet. Erneutes dreimaliges 10minütiges Waschen mit Aqua destillata verminderte die Hintergrundfärbung der Fluoreszenzflüssigkeit. Die anschließend hergestellte 1:1 ECL-Lösung (Enhanced Chemolumineszenz) wurde direkt auf die Membran gegeben und im LAS 3000 (Luminescent Image Analysis System) ausgewertet. Eine am sekundären Antikörper gebundene Peroxidase, welche enzymatische Aktivität besitzt, ermöglicht das Erkennen des Antigen-Antikörper-Komplexes.

4.3.5. Rehybridisierung

Durch die abhängig von der Proteinbandenstärke der Membran gewählten 8-15 minütige Rehybridisierung in einer dafür hergestellten und erwärmten Pufferlösung (50mM 2-Mercapto-Ethanol, 2% SDS, 1M Tris-HCL mit pH 6,7) wurde der gebundene Antikörper im 50°C Wasserbad wieder gelöst. Mehrmaliges intensives Waschen mit Aqua destillata und erneutes Abblocken der Membran mit BSA 4% ermöglichte eine Inkubation der Blot-Membran mit dem entsprechenden nicht phosphorylierten primären Antikörper.

Die dritte Inkubation diente dem Nachweis der Menge an β -Aktin (einem Housekeeping-Protein, welches in nahezu allen Zellen in gleicher Konzentration vorliegt) um eine exakte Verteilung der einzelnen Proteinmengen bei allen aufgetragenen Proben zu illustrieren.

4.4 FACS-Analyse

4.4.1. Aufbau und Funktionsweise des Durchflusszytometers

Mittels der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS) können Antigene auf der Zelloberfläche bzw. innerhalb der Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern markiert sind, gezählt, sortiert und identifiziert werden. Im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie, wo die Zellen adhärent vorliegen, liegen diese hier in einer Zellsuspension und somit in ihrer physiologischen Struktur vor. Durch einen im FACS-Gerät integrierten Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm werden die Zellen einzeln wie an einer Perlenkette aufgereiht mit

Hilfe einer ständig in hoher Geschwindigkeit fließenden Trägerflüssigkeit bestrahlt. Die Zellen sind fixiert und werden einzeln von einem Laserstrahl getroffen. Die am phosphorylierten Antikörper haftenden Fluorochrome (pERK1/2- und pp38-MAP-Kinase) werden aktiviert und es kommt zur Freisetzung von Fluoreszenzsignalen, die von einem Detektor gemessen werden. Dieser kann sowohl die Wellenlänge als auch die Intensität ermitteln. Das FACS-Gerät kann so innerhalb von Sekunden Tausende von Zellen untersuchen und sortieren. Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Aufbau des optischen Systems eines Durchflusszytometers.

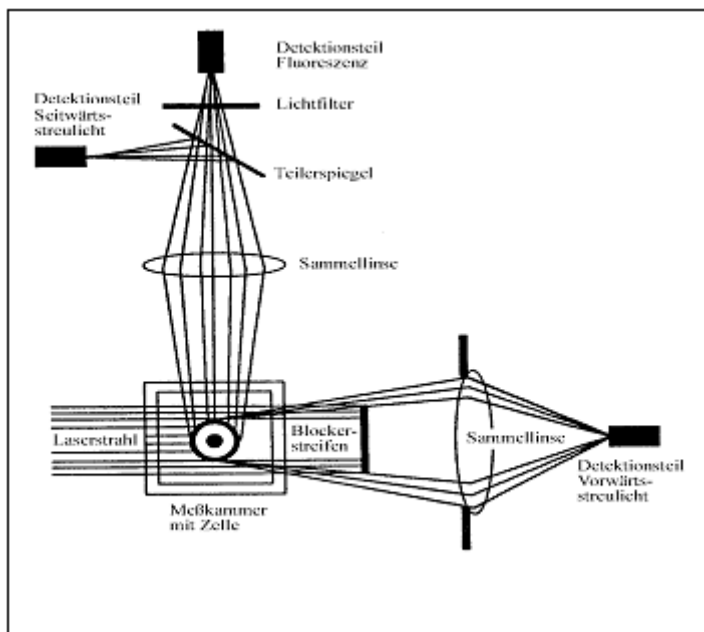


Abbildung 6: Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers (Quelle: „Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik“ von G. Schmitz und G. Rothe, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, New York 1994)

Durch die Beugung des Laserlichts durch einfallende Partikel und Lichtstreuung an der Zelle entsteht auch Streulicht, das von der Zellgröße, intrazellulärer Bestandteile und der Zellmembranstruktur beeinflusst wird. Das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter, FCS) ist proportional zur Zelloberfläche und zur Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) entspricht der Granularität der Zelle. Photoröhren und Photodioden konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, die anschließend linear über die Scatter und logarithmisch über die Fluoreszenz angezeigt werden. Über die ermittelte Fluoreszenzintensität lässt sich die intrazelluläre Konzentration der Proteine bestimmen, wobei die Fluoreszenzintensität mit den endogen gebundenen aktivierten Antikörpern pp38-

und pERK1/2-MAP-Kinase korreliert. Als Negativkontrolle der folgenden Untersuchungen diene die „serumfreie“ Probe ohne fluoreszierende Antikörper, wodurch die Autofluoreszenz der Zelle bestimmt wird und die Fluorochromsignale gut abgrenzbar sind.

4.4.2. Probenherstellung und Datenauswertung

Die MCF-7 Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2 und 3.3 vorbereitet und in einer definierten Anzahl von 10^6 Zellen in 25cm^2 Flaschen ausgesät. Als Zwischenschritt diene die generelle serumfreie Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS und die Inkubation mit 50nM und 100nM BMP-2, 50nM und 100nM PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat) und $2\mu\text{g/ml}$ Anisomycin folgten. Nach definierten Zeitpunkten von 30min und 4 Stunden wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin von der Oberfläche gelöst. Im Verhältnis 1:1 mit Trypsin wurde Phosflow Fix Puffer I (BD Bioscience) zugegeben, welcher die Zellen für die Färbung permeabilisierte. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C und anschließendem Suspendieren und Pelletieren in PBS wurde Perm Puffer III (BD Bioscience) zur optimalen intrazellulären Färbung mit den phosphorylierten Antikörpern zugeführt und das Ganze für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach weiterem mehrmaligen Waschen mit PBS mit 2mmol EDTA konnte der Suspension $10\mu\text{l}$ phosphorylierter pp38- oder pERK1/2-Antikörper einzeln oder zusammen im Verhältnis 1:1 zugegeben werden. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtverschluss wurden die gefärbten Zellen resuspendiert, und zur Auswertung vorbereitet. Die Probenmessungen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers vom Typ FACSort der Firma Becton Dickinson GmbH Heidelberg durchgeführt. Vorwärts- und Seitwärtsscatter wurden linear eingestellt, die Fluoreszenzdaten logarithmisch aufgezeichnet.

Über den Kanal FL-1 mit einem Bandpassfilter von 530/30 nm und Kanal FL-2 mit einem Bandpassfilter von 585/42nm wurde die Fluoreszenz bestimmt und mit der Cell Quest Pro® Software konnten die Daten aus 10000 Zellen pro Einzelmessung mit einer Messrate von 50-150 Zellen/sec durch die Meßeinstellung „langsam“ erhoben und grafisch ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität wurde anhand eines Histogrammes und die Häufigkeitsverteilung der Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität dargestellt.

5. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten anhand bisheriger Erkenntnisse tumorbiologische Effekte ausgewählter Knochenmorphogenesefaktoren im Mammakarzinom auf zytoplasmatischer und nukleärer Ebene molekularbiologisch untersucht werden. Literaturangaben zufolge lösen verschiedene Knochenmorphogenesefaktoren unterschiedliche Prozesse in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 aus. Das bekannte BMP-2 als Tumorsuppressor aber auch Tumorprogressor spielt dabei eine entscheidende Rolle. Im Vordergrund standen die Untersuchungen ausgewählter BMPs wie BMP-2, BMP-3 und seiner Mutanten, BMP-6 und BMP-7, dem bekannten Inhibitor Noggin und der extrazellulären Domäne der Rezeptor Kinase ALK-3 (eD ALK-3) auf zellulärer und nukleärer Ebene. Es wurden mit Hilfe phosphorylierter und nicht phosphorylierter Antikörper verschiedene Transduktions- und Transkriptionswege beurteilt.

Der erste Schritt bestand darin, mittels Realtime PCR die mRNA verschiedener zu untersuchender Gene im Zellkern der Tumorzellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte im semiquantitativen Western Blot vor allem der Grad der Phosphorylierung bzw. die Aktivierung ausgewählter endogener Proteine bestimmt werden. Die quantitative, multiparametrische Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie stellte im dritten Schritt eine Möglichkeit zur Ergänzung und Prüfung der ermittelten Ergebnisse des Western Blots dar. Sie diente der unmittelbaren Untersuchung von BMP-Effekten intrazellulär und zum Aufbau des Systems.

Um zu überprüfen, inwiefern neben BMP-2 andere BMPs einen Einfluss auf das intrazelluläre Verhalten von MCF-7 ausüben, wurden die BMPs in der gleichen Konzentration von 100ng/ml unter Beibehaltung der Versuchsbedingungen variiert. BMP-6 und BMP-7 repräsentieren eine Untergruppe der BMPs, die strukturell verwandt sind, aber unterschiedliche intrazelluläre Effekte bewirken. Sie setzen sich in der Zellmodulation deutlich von BMP-2 ab. BMP-3 ist ein Molekül, das strukturell eine Sondergruppe darstellt und in der tumorigenen Aktivität des Mammakarzinoms bisher nur unzureichend charakterisiert ist.

eD ALK-3 wurde als Beispiel eines TGF- β -Typ-I-Rezeptors ausgewählt. Er ist essentieller Bestandteil zur Bindung des BMP-2 in vielen Geweben. Es wurde durch Einsatz der extrazellulären Domäne des ALK-3 überprüft, ob es ein zwingendes Zusammenspiel zwischen dem Typ-I- und Typ-II-Rezeptor durch BMPs gibt, wodurch die pSMAD1/5/8 Induktion ausgelöst wird und die Formation von SMAD-Komplexen, z.B. SMAD1 und 4, und die anschließende nukleare Translokation folgt (Hoodless et al. 1996). eD ALK-3 ist ein potentieller Rezeptor für BMP-2 (Valcourt et al. 2002) und BMP-6 (Kaivo-oja et al. 2006).

Als nativer extrazellulärer Antagonist stand Noggin zur Verfügung. Es inhibiert die Bindung von BMPs an die Rezeptoren und verhindert somit die Aktivierung der Transduktionskaskade in der Zelle.

Experimentelle Konzentrations- und Zeitveränderungen sollten eine Vorstellung der Variabilität im Tumorprozess geben.

Alle Daten basieren auf dreimaliger Wiederholung aller Experimente.

Für die Auswertung und Beurteilung der mRNA- und Western Blot-Grafiken wurde ein Signifikanzbereich von 1,5 und grösser festgelegt. Dies bedeutete, dass alle Werte über 1,5 gegenüber dem serumfreien Wert als endogene Modulation bewertet wurden.

5.1. Effekte des BMP-2

Die Wirkung von BMP-2 auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurde sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene untersucht. BMP-2 ist als Tumorinduktor bekannt und wird in der vorliegenden Arbeit als Grundlage gesehen, um die Wirkung der eingesetzten Knochenmorphogenesefaktoren zu bewerten.

5.1.1. Effekte von BMP-2 auf mRNA Ebene

Zunächst wurden auf mRNA Ebene ausgewählte Gene mittels RT-PCR untersucht, die unterschiedlich stark durch das exogen zugeführte BMP-2 auf Transkriptionsebene reguliert werden und im Zusammenhang mit Tumorentstehung im Mammakarzinom stehen. Für alle untersuchten Gene standen spezifische Primer zur Verfügung (s. Methodik). Die Berechnung der Expressionssteigerung E erfolgte mithilfe der Kopienanzahl der spezifischen

Genabschnitte durch die zeitlich entsprechende serumfreie Negativkontrolle. Die zeitgleiche Untersuchung von β -Aktin diente der Kontrolle und blieb unverändert.

ID-1 (engl. Inhibitor of differentiation) als Transkriptionsfaktor und Kontrollgen spielt eine wichtige Rolle in der Neovaskularisierung von Tumoren (Raida et al. 2005). Nach der 4 stündigen Inkubation der MCF-7-Zellen mit BMP-2 wurde eine Steigerung der ID-1 Expression auf das 23,3fache gegenüber dem serumfreien Wert ermittelt. Nach 8stündiger Inkubation erfolgte eine 10,2fach erhöhte Expression gegenüber dem serumfreien Wert. Des Weiteren wurde der mRNA-Gehalt der Rezeptortyrosinkinase Sky nach externer Stimulation von 10^6 Zellen MCF-7 mit BMP-2 untersucht. Es konnte eine im Vergleich zu ID-1 schwächere Expression auf das 2,1fache gegenüber der serumfreien Kontrolle nach 4 Stunden Inkubation und eine weitere Steigerung auf das 4,4fache gegenüber dem serumfreien Wert nach 8 Stunden Inkubation mit BMP-2 nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen erfolgten mit genspezifischen Primern für Noggin, BMP-3, BMP-6 und BMP-7. Der BMP-2-mRNA-Gehalt zeigte eine signifikante Steigerung auf das 27,3fache gegenüber der serumfreien Kontrolle nach 4 Stunden. Zum zweiten Zeitpunkt blieb diese aber auf niedrigem Niveau. Die Expression der mRNA von BMP-3, BMP-6 und BMP-7 zeigten vergleichsweise geringe Steigerungen gegenüber der serumfreien Kontrolle, wobei die mRNA von BMP-3 und BMP-6 nach 4 Stunden in größerer Menge um den Faktor 5,4 bzw. 1,8 exprimiert wurde. Eine schwache Genexpression von Noggin erfolgte auf das 1,3fache gegenüber der serumfreien Kontrolle nach 4h und eine Expression auf das über 5fache nach 8h.

Abbildung 7 stellt eine Übersicht dar, in der ersichtlich wird, dass besonders die ID-1-mRNA und die BMP-2-mRNA nach 4-stündiger Inkubation einer verstärkten Produktion im Zellkern unterlag. Weiterhin war eine deutliche Erhöhung des ID-1 nach 8 Stunden feststellbar. Auch die anderen untersuchten Gene zeigten zeitabhängige Expressionsanstiege über den Signifikanzbereich von 1,5. Einzig die BMP-7-mRNA blieb unbeeinflusst durch die BMP-2 Stimulation.

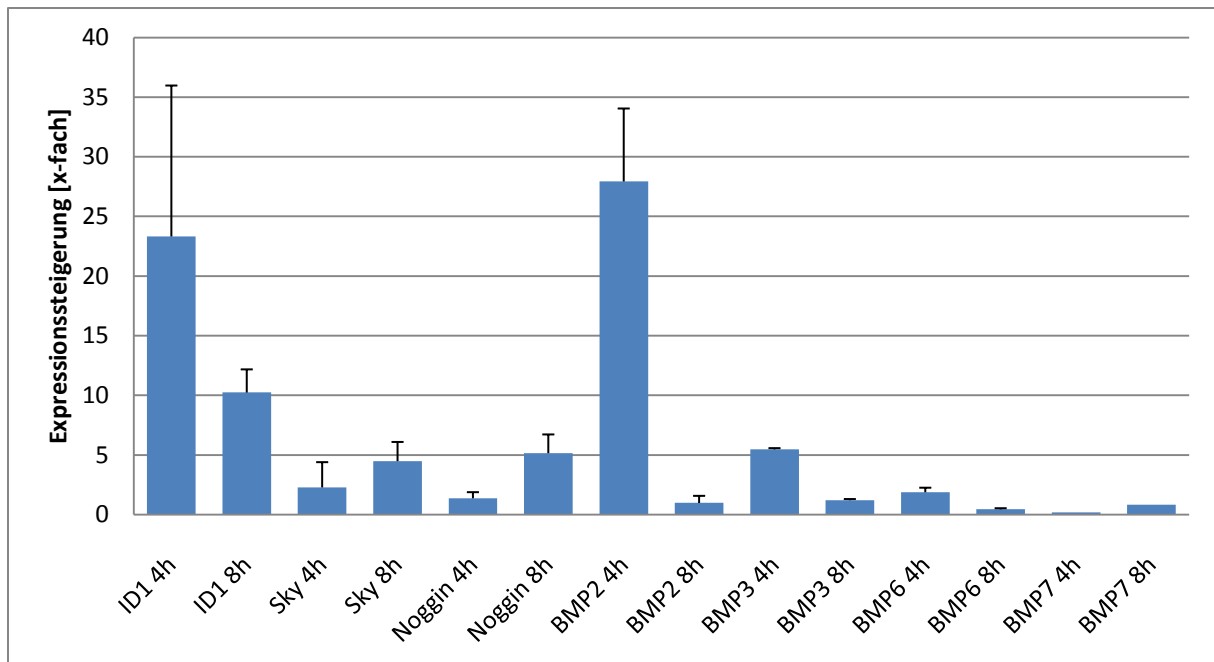


Abbildung 7: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4 und 8stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

5.1.2. Effekte von BMP-2 auf die Induktion verschiedener Signaltransduktionswege

Nachdem an der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 für die besonders BMP-2 responsiven Gene ID-1 und Sky eine deutliche Expression gezeigt werden konnte, sollte der Effekt von BMP-2 auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse untersucht werden.

Mithilfe phospho-spezifischer und nicht phospho-spezifischer Antikörper in den Standardkonzentrationen von 1:1000 bzw. 1:500 in BSA 4% konnte die Aktivierung der endogenen Proteine pSmad1/5/8, pp38-MAP-Kinase, pERK1/2-MAP-Kinase und pAKT-Kinase untersucht werden. Experimentelle Grundlage für eine optimale Vergleichbarkeit der Proben waren u.a. eine konstante Zellzahl von 10^6 MCF-7 Zellen in der Aussaat, die zweizeitige exakte Unterbrechung der Inkubation mit dem Knochenmorphogenesefaktor 2 bzw. der serumfreien Proben und eine genau definierte Proteinmenge von 50µg in der Elektrophorese.

Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Durch die zweifache densitometrische Vermessung und Auswertung der Western Blot-Banden und der Berechnung des Quotienten Q1 aus phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Protein konnten die Proteinbanden im Western Blot sehr gut objektiviert werden. Die weitere Berechnung von Q2 ermöglichte eine genaue Aussage bezüglich der BMP-2-Wirkung auf die Aktivierung der jeweiligen endogenen Signalwege durch Vergleich mit der serumfreien Kontrolle. β -Aktin als Housekeeping-Protein wurde abschließend zur Proteinmengenkontrolle herangezogen.

$Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$

$Q2 = Q1 / \text{Kontrolle serumfrei}$

Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-2 zeigte einen deutlichen Anstieg des intrazellulären Proteingehaltes von pSmad158/Smad1 in beiden Zeitintervallen (Abbildung 8). Nach 4h stieg die Phosphorylierung auf das 4fache, nach 8h auf das 7fache gegenüber „Serumfrei“. Es kam zu einer deutlichen Aktivierung von pSmad1/5/8 zu beiden Zeitpunkten.

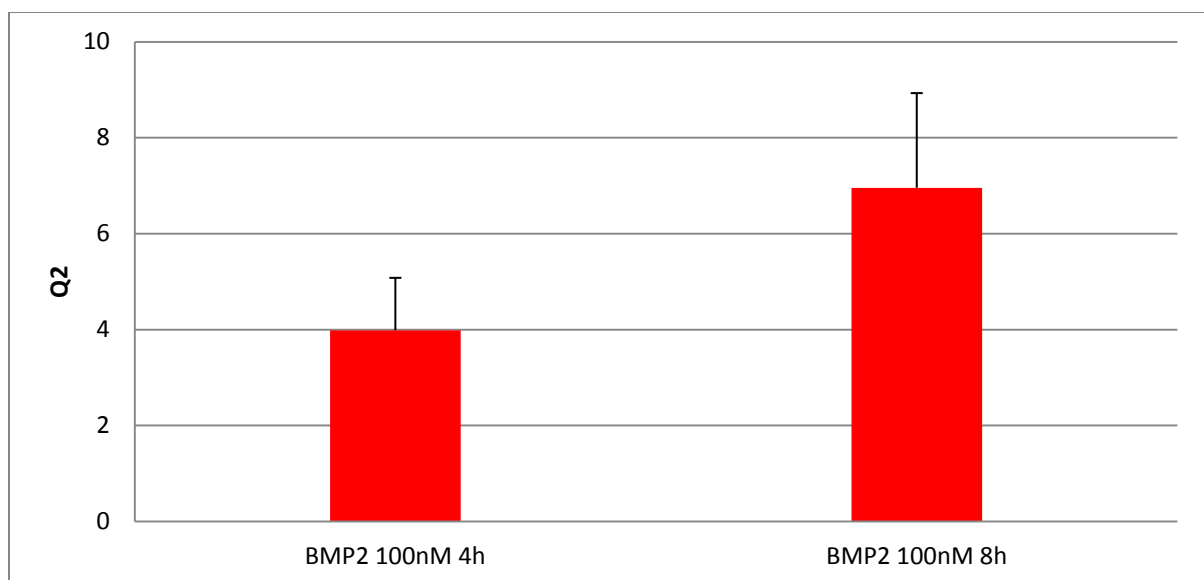


Abbildung 8: Aktivierung von pSmad158/Smad1 nach 4h und 8h Exposition mit BMP-2 100nM. Die Werte sind auf die zeitlich entsprechenden serumfreien Kontrollwerte bezogen. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1 / \text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Nachdem durch BMP-2 eine Aktivierung auf dem Smad-Signalweg positiv war, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die extrazelluläre Zellstimulation mit BMP-2 100nM auch Auswirkungen auf andere endogene Signalwege ausübt. Anhand ausgewählter Mitglieder der Serin/Threonin-Kinasen wie der MAP-Kinase p38 und der extrazellulär signalregulierten Kinase ERK1/2 konnte eine Aktivierung dieses Signalweges beurteilt werden.

Bei der Auswertung der Western Blot-Daten (Abbildung 9) zeigte sich weder eine Konzentrationsänderung der aktiven, phosphorylierten Form von p38 und pERK1/2, noch an dessen Substrat, so dass keine intrazelluläre Aktivierung dieser Kinasen nachweisbar war.

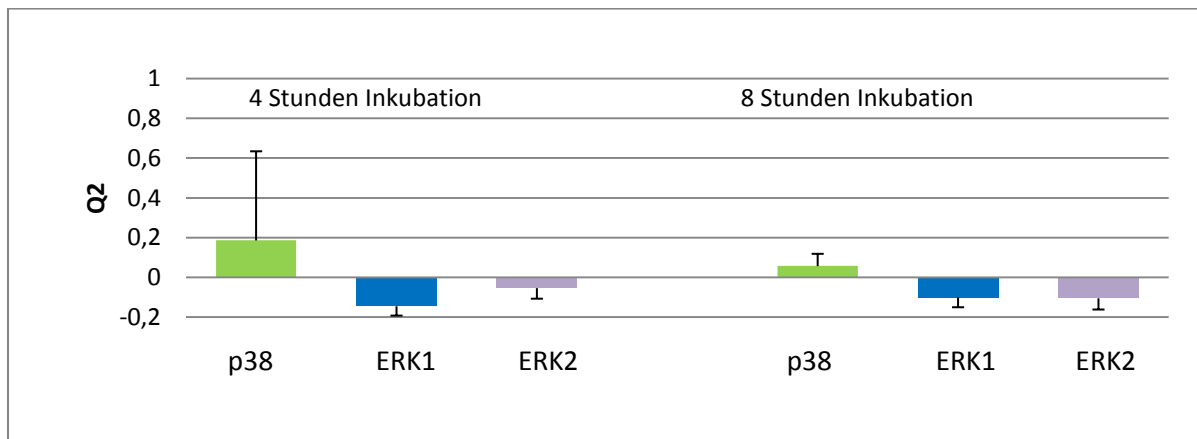


Abbildung 9: Modulation der Signaltransduktion von aktiviertem, phosphorylierten pp38 gegen inaktiviertes p38 und aktiviertem, phosphorylierten ERK1/2 gegen inaktiviertes ERK1/2 unter Berücksichtigung des entsprechenden serumfreien Kontrollwertes und β -Aktin nach extrazellulärer Inkubation von BMP-2 100nM. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Ein weiterer ausgewählter Transduktionsweg wurde abschließend mit BMP-2 betrachtet. Hierfür wurde das aktive pAKT gegen Gesamt-AKT betrachtet. Die Serin/Threonin-Kinase AKT moduliert diverse „downstream“-Signalwege wie Zellproliferation, Differenzierung, Zellüberleben und Apoptose (s. Yeun-Kyung Shin et al., 2007). In den MCF-7-Zellen war keine verstärkte Phosphorylierung von AKT durch BMP-2 erkennbar. Nach 4-stündiger Expression mit BMP-2 kam es zu keiner nachweisbaren Aktivierung des AKT-Signalweges. Die zweite Inkubationszeit erbrachte lediglich eine Steigerung auf das 0,2fache.

Es konnte somit festgestellt werden, dass die extrazelluläre Inkubation mit 100nM BMP-2 bei den untersuchten Signalkaskaden nur auf dem Smad-Signalweg eine deutliche

Aktivierung auslöste, der MAP-Kinase-Signalweg und die intrazelluläre Stimulation der AKT-Kinase wurden davon nicht beeinflusst.

5.1.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BMP-2 eine Signaltransduktion über den Smad-Signalweg auslöst. Eine längere Inkubation der Zellen über 8h ergab ein erhöhtes Expressionsniveau. Über das phosphorylierte Protein pSmad1/5/8 wurde eine Kaskade intrazellulärer Prozesse ausgelöst, die zu einer zellkernspezifischen Transkription von Genen führte. Besonders ID-1 und das Gen BMP-2 wurden zeitabhängig vermehrt exprimiert, wobei eine 4-stündige Expression stärkere Effekte erzeugte. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass BMP-2 generell endogene Prozesse in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 beeinflusst. Sowohl im Hinblick auf die Proteine als auch auf die veränderten Gene zeigten sich zeitabhängige Unterschiede. Die Wirkung von BMP-2 auf die MCF-7 Zellen ist stark abhängig von der Expositionsdauer.

Anhand der BMP-2 Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Zellkultursystem zur Analyse der BMP-Wirkung geeignet war. Die weiterführenden Analysen wurden in dieser standardisierten Form durchgeführt.

5.2. Effekte von BMP-3, BMP-6 und BMP-7

5.2.1. Effekte von BMP-3 auf mRNA Ebene

BMP-3 wurde erstmals 1991 beschrieben (Tabas et al. 1991). Es induziert wie die meisten BMPs die Fähigkeit zur enchondralen Knochenbildung. In den hier durchgeführten Experimenten wurden BMP-3 S, BMP-3 I, BMP-3 Sm04 untersucht, die sich entweder durch die Länge vom BMP-3 unterscheiden oder im Labor hergestellte Mutanten (BMP-3 Sm04) darstellen. BMP-3 S ist ein Protein, welches wie alle biologisch aktiven BMPs mit einem terminalen Kohlenstoffatom endet. Es besitzt die Eigenschaft, schnell am ersten proteolytischen Ende gespalten zu werden. Den Gegensatz stellt BMP-3 I dar, welches viel länger ist und an der zweiten proteolytischen Spaltstelle 147 Aminosäuren weiter N-terminal

aufgespalten wird. Die Mutanten BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 wurden an bestimmten Aminosäuren in der Rezeptor-Bindungsregion verändert, wodurch das BMP-3-Motiv gegen ein BMP-2 ähnliches Motiv verändert wurde, um herauszufinden, mit welcher AS-Sequenz eine BMP-2-Wirkung erlangt wird.

Die bereits im Abschnitt 5.1.1 untersuchten Zielgene wurden erneut eingesetzt. Die Inkubationszeiten von 4 Stunden und 8 Stunden wurden beibehalten. Die zeitlich entsprechenden serumfreien Proben und β -Aktin dienten der internen Kontrolle.

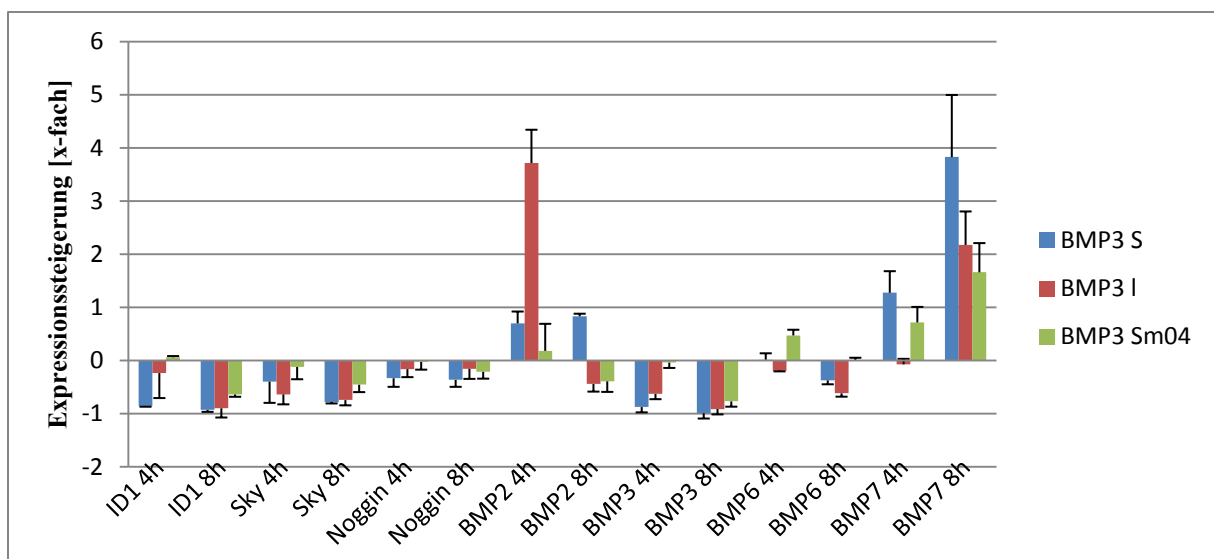


Abbildung 10: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4 und 8stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit je 100nM BMP-3 S, BMP-3 I und BMP-3 Sm04 nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit den verschiedenen Varianten von BMP-3 zeigte sehr unterschiedliche Effekte auf nukleärer Ebene, abhängig vom jeweiligen BMP-3 (Abbildung 10). Alle Varianten schienen besonders das Gen BMP-7 nach 8h Inkubation stärker zu induzieren, wobei der BMP-3 S Effekt mit einer 3,7fachen Steigerung gegenüber serumfreier Kontrolle am deutlichsten ausgeprägt war. Des Weiteren zeigte sich eine 3,6 fache Überexpression des Gens BMP-2 gegenüber „Serumfrei“ nach 4h Inkubation mit BMP-3 I. Bei den anderen überprüften Genen wurde eine Repression der Aktivität nachgewiesen. BMP-3 S zeigte, abgesehen von der BMP-7-mRNA nach 8 Stunden, eine schwache, zeitlich

unabhängige Transkriptionssteigerung. BMP-3 I konnte in Hinsicht auf das Gen BMP-2 mit dem extrazellulären BMP-2 verglichen werden, ID-1 wurde über BMP-3 nicht exprimiert.

5.2.2. Effekte von BMP-3 auf die intrazelluläre Signaltransduktion

Analog zu den Western Blot-Untersuchungen mit BMP-2 wurden die ausgewählten BMP-3 Varianten betrachtet. Bei den verschiedenen BMP-3 ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse auf intrazellulärer Proteinebene. BMP-3 S und BMP-3 I zeigten unabhängig von der Zeit keine Induktion der Smad-Signalkaskade, was Hinweis auf eine antagonistische Rolle zu den übrigen BMPs bedeuten kann. BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 lösten zu beiden Zeitpunkten eine Aktivierung aus, wobei zeitliche Unterschiede deutlich wurden. Während BMP3 Sm04 nach 4 Stunden Inkubation eine stärkere Aktivierung gegenüber der 8stündigen zeigte, war die Phosphorylierung von Smad1/5/8 durch BMP-3 Sm05 zu beiden Zeitpunkten auf das 4 bis 5fache gegenüber der serumfreien Kontrolle erhöht (Abbildung 11).

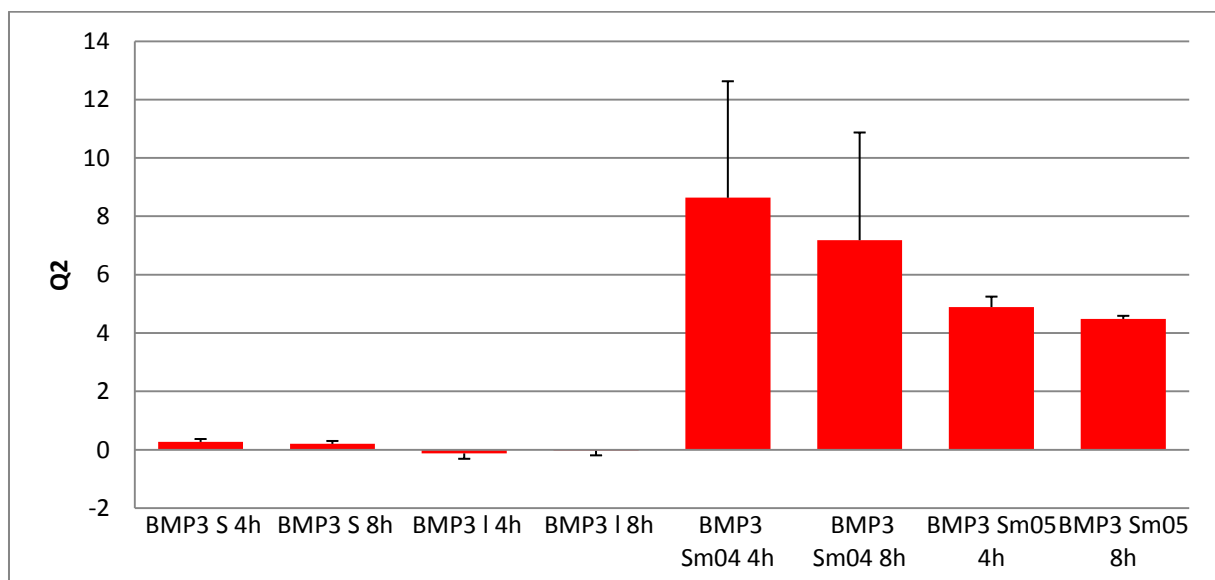


Abbildung 11: Aktivierung von pSmad1/5/8 nach Inkubation von MCF-7 mit BMP-3 S, BMP-3 I, BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Ein weiterer untersuchter Signaltransduktionsweg war der AKT-Signalweg. Die Western Blot-Analyse zeigte eine Repression des AKT-Signalweges durch BMP-3 Sm04 nach 4 Stunden (Abbildung 12). Keines der extrazellulären Proteine des BMP-Signalnetzwerkes konnte eine Signaltransduktion der AKT-Proteine auslösen. Es zeigte sich eine sehr schwache zeitabhängige, insgesamt aber nicht signifikante Zunahme der Phosphorylierung von AKT, wobei nach der 8stündigen Applikation von BMP-3 Sm05 der größte Anstieg mit 0,53fach gegenüber „Serumfrei“ zu verzeichnen war.

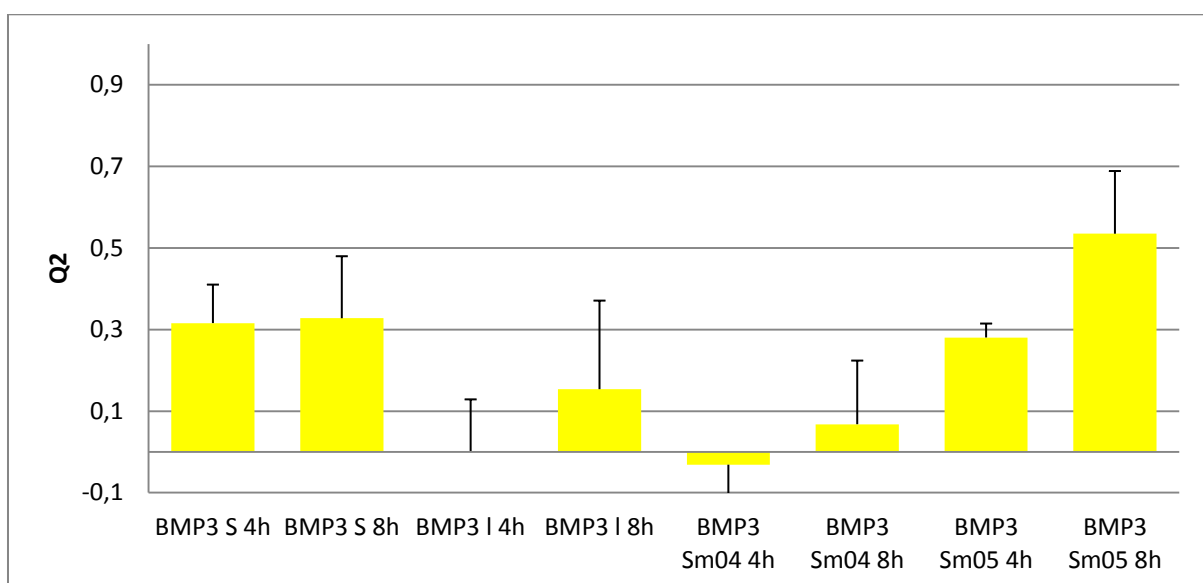


Abbildung 12: Aktivierung von pAKT nach Inkubation mit BMP-3 S, BMP-3 I, BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Darüber hinaus wurden Phosphorylierungsanalysen am MAP-Kinase-Signalweg untersucht. Sowohl die aktive, phosphorylierte Variante als auch das Gesamtprotein von p38- und ERK1/2-MAP-Kinase wurden unter gleichen Bedingungen inkubiert und analysiert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Steigerungen des Phosphorylierungsstatus der p38-MAP-Kinase bzw. der ERK1/2-MAP-Kinase durch BMP-3 I und BMP-3 Sm04. Eine schwache temporäre Aktivierung aller endogenen MAP-Kinasen konnte durch BMP-3 Sm05 detektiert werden (Abbildungen 13 und 14).

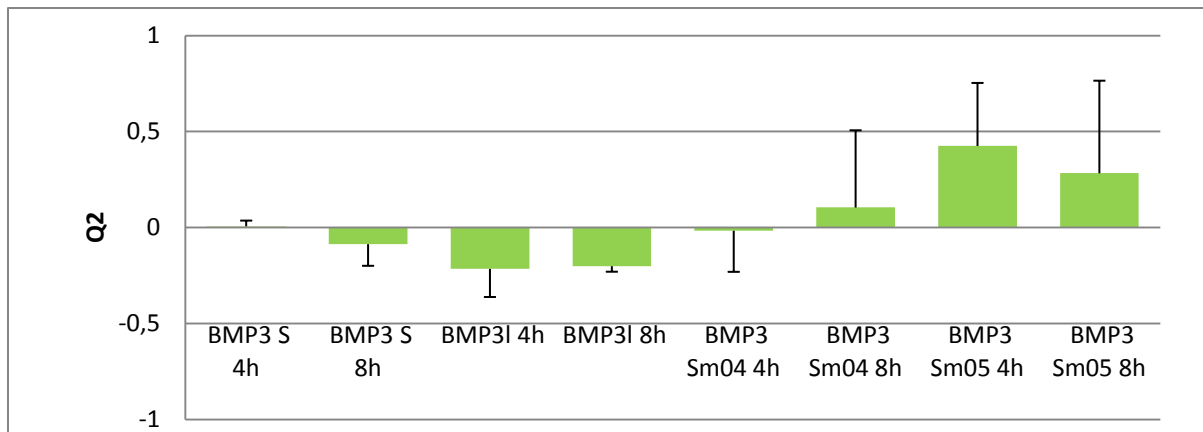


Abbildung 13: Aktivierung von pp38-MAP-Kinase nach Inkubation mit BMP-3 S, BMP-3 I, BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

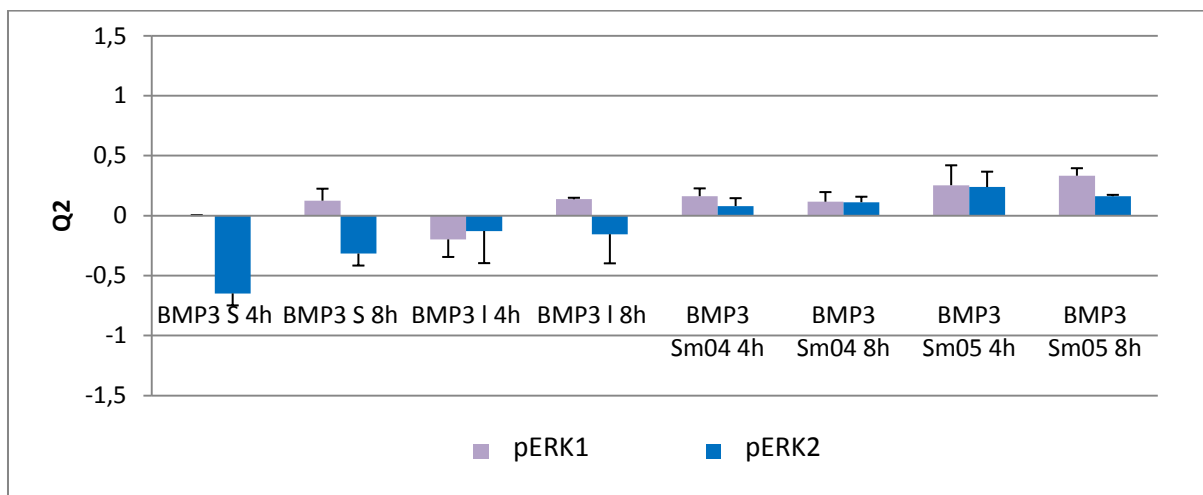


Abbildung 14: Aktivierung von pERK1/2-MAP-Kinase nach Inkubation mit BMP-3 S, BMP-3 I, BMP-3 Sm04 und BMP-3 Sm05 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

5.2.3. Effekte von BMP-6 auf mRNA Ebene

BMP-6 als Mitglied der TGF- β -Familie ist ein autokriner Stimulator der Chondrozytendifferenzierung und steht unter anderem in Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung des Nierensystems (s. Einleitung).

Aufgrund des extrazellulären Einflusses von BMP-6 konnte auf mRNA-Ebene (Abbildung 15) eine signifikante Expression der Gene ID-1 und BMP-2 zu beiden festgelegten Zeitpunkten nachgewiesen werden, wobei die mRNA von BMP-2 nach 4 Stunden am stärksten exprimiert wurde und nach 8 Stunden Inkubation mit BMP-6 auf ein Zehntel absank. Die ID-1 mRNA zeigte zu beiden Zeitpunkten über das 9fache Steigerung gegenüber der serumfreien Kontrolle. Nach 4stündiger Inkubation mit BMP-6 wurde die Zelle zur Autoinduktion durch Expressionssteigerung seines Gens BMP-6 angeregt. Mit Ausnahme von BMP-7 und Noggin zeigten alle anderen untersuchten Gene erhöhte Transkriptionswerte nach 4h Inkubation, zum zweiten Zeitpunkt waren die Werte ohne Ausnahme deutlich schwächer. Die Gene Noggin und BMP-7 zeigten sich unbeeinflusst durch die exogene Stimulation mit BMP-6.

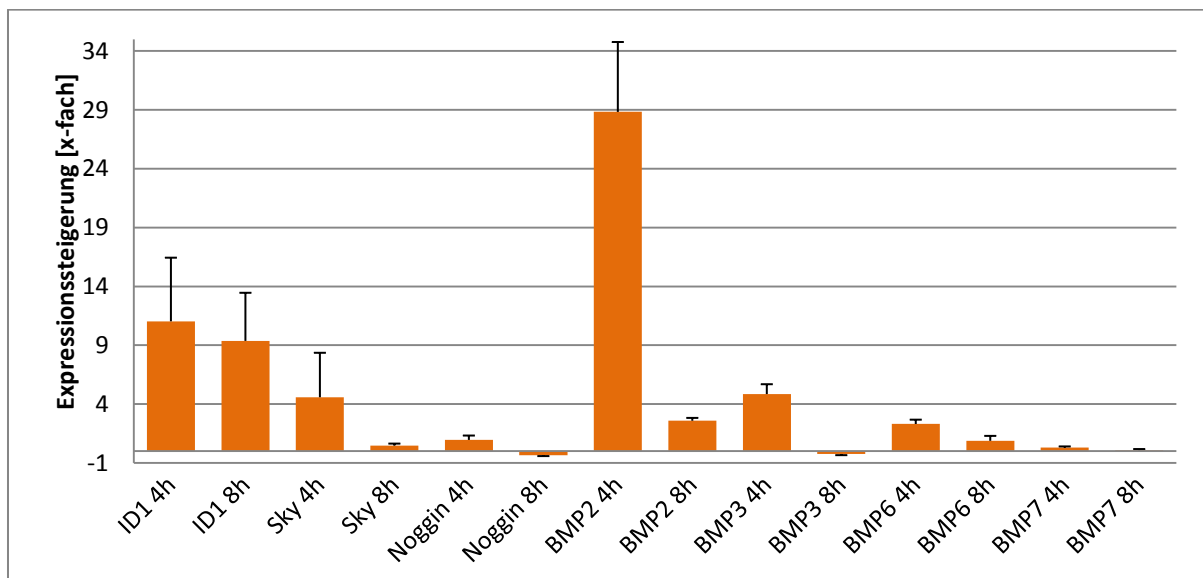


Abbildung 15: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4 und 8stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-6 nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

5.2.4. Effekte von BMP-6 auf die intrazelluläre Signaltransduktion

Um die Einflüsse des BMP-6 auf intrazelluläre Signalwege zu beurteilen, wurden die Phosphorylierungssteigerungen von pSmad1/5/8 und der MAP-Kinasen pp38 bzw. pERK1/2 sowie pAKT kontrolliert. Es zeigte sich eine zeitabhängige, signifikante Steigerung von pSmad1/5/8, also eine deutliche intrazelluläre Aktivierung des Smad-Signalweges durch die externe Wirkung von BMP-6. Nach einer 4stündigen Inkubation der Zellen mit BMP-6 kam es zu einer Zunahme von pSmad158/Smad1 um den Faktor 24,2 gegenüber serumfreier Kontrolle, nach einem weiteren Zeitintervall von 8 Stunden konnte eine Aktivierung um Faktor 20,7 gegenüber „Serumfrei“ ermittelt werden (Abbildung 16).

Eine weitere Auffälligkeit zeigte sich in der Aktivierung des AKT-Signalweges. Es kam zu einer deutlichen, spezifischen Bindung der phosphorylierten Form von AKT. Während beider Zeitintervalle konnte eine Erhöhung nachgewiesen werden, nach 4 Stunden stieg die Phosphorylierung auf das 1,7fache und nach 8 Stunden auf das 2,4fache gegenüber „Serumfrei“. Es wurde deutlich, dass BMP-6 auch über die Transduktion des intrazellulären AKT-Proteins die Brustkrebszelle beeinflusst (Abbildung 17). Sowohl auf dem p38-MAP-Kinase- als auch auf dem ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweg wurde keine Induktion der Phosphorylierung ausgelöst.

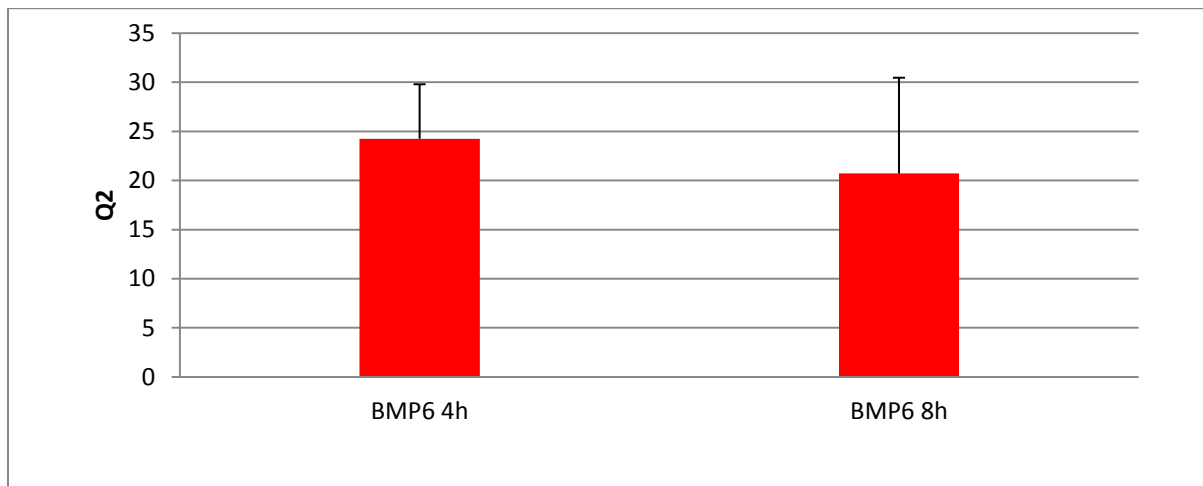


Abbildung 16: Aktivierung von pSmad1/5/8 nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-6 100nM für 4h und 8h unter Berücksichtigung der entsprechenden serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

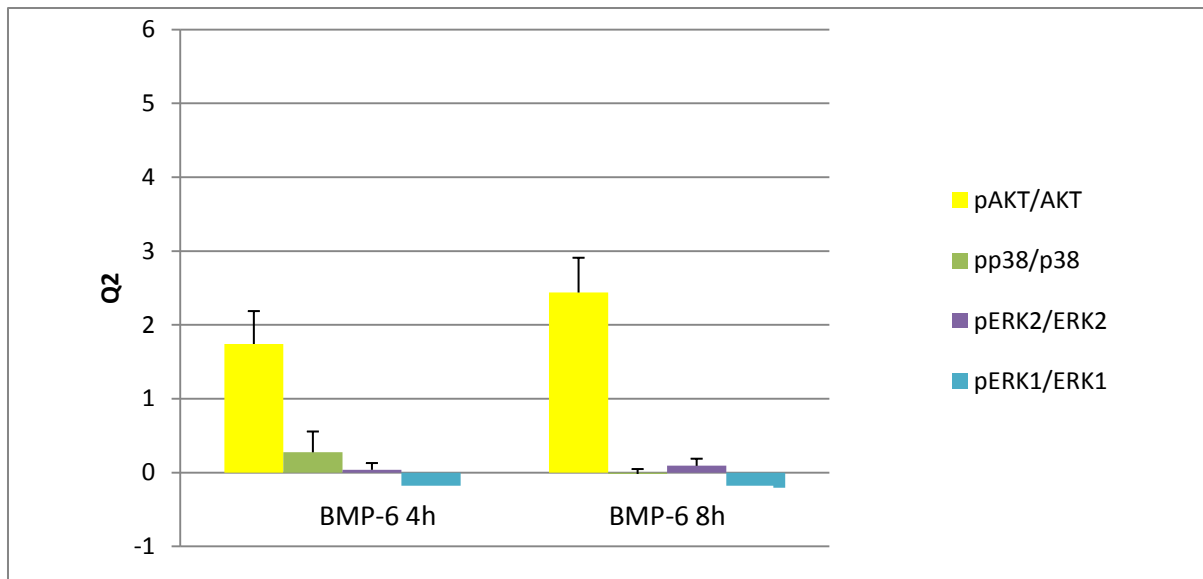


Abbildung 17: Aktivierung von pAKT-, pp38-MAP-Kinase und pERK1/2-MAP-Kinase nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-6 100nM für 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

5.2.5. Effekte von BMP-7 auf mRNA Ebene

Die experimentelle Untersuchung von BMP-7 wurde analog BMP-2, BMP-3 und BMP-6 beibehalten. β -Aktin diente wieder der Kontrolle der im Western Blot aufgetragenen Proteinmenge und die jeweiligen serumfrei inkubierten Proben wurden auf die ermittelten mRNA-Werte der jeweiligen Zeiten von 4h und 8h verrechnet, so dass die mRNA-Mengen objektiv bewertet werden konnten. Wie in Abbildung 18 zu sehen, stieg der mRNA-Gehalt von ID-1 am deutlichsten nach 4h Inkubation auf das 34,9fache, gefolgt vom mRNA-Gehalt des BMP-2 zur gleichen Zeit mit einer 11,9fachen Steigerung gegenüber serumfreier Kontrolle. Auch die anderen untersuchten Gene zeigten eine Expression auf über das 1,5fache der serumfreien Kontrolle nach 4h Inkubation. Zum zweiten Zeitpunkt, also nach 8h, fiel die Expression unter die Grenze von 1,5 ab. Das Gen Noggin stellte insofern eine Ausnahme dar, als nach 4h eine schwächere Expression denn nach 8h nachweisbar war, jedoch zu beiden Zeitpunkten eine Steigerung zu verzeichnen war. Das Gen BMP-7 zeigte keine veränderte Expression, somit keine Autoinduktion.

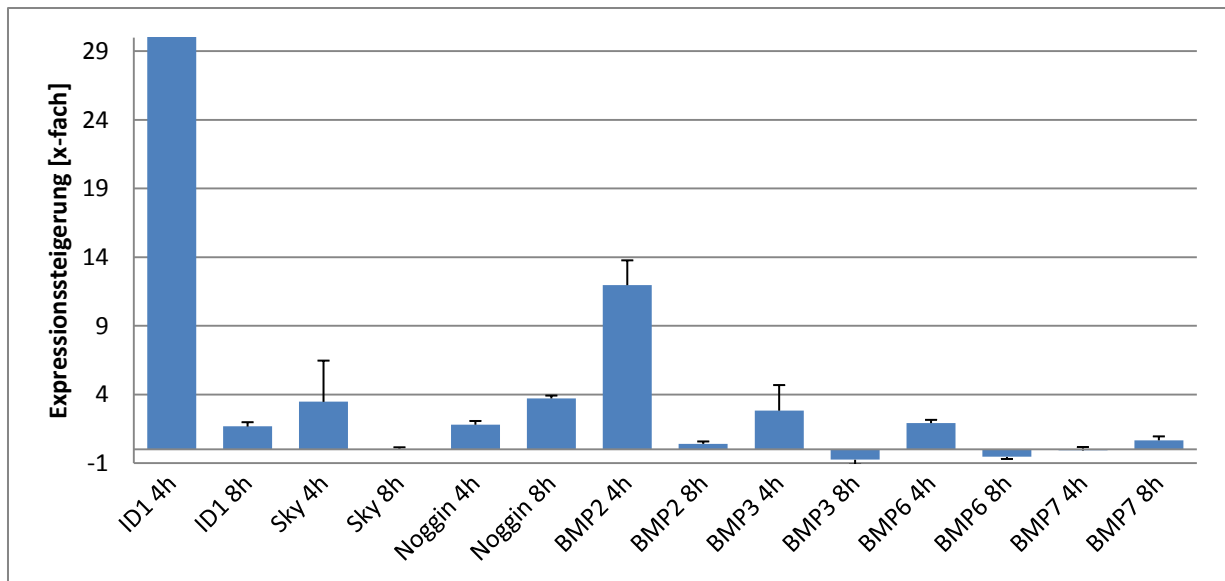


Abbildung 18: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4- und 8-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-7 nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

5.2.6. Effekte von BMP-7 auf die intrazelluläre Signaltransduktion

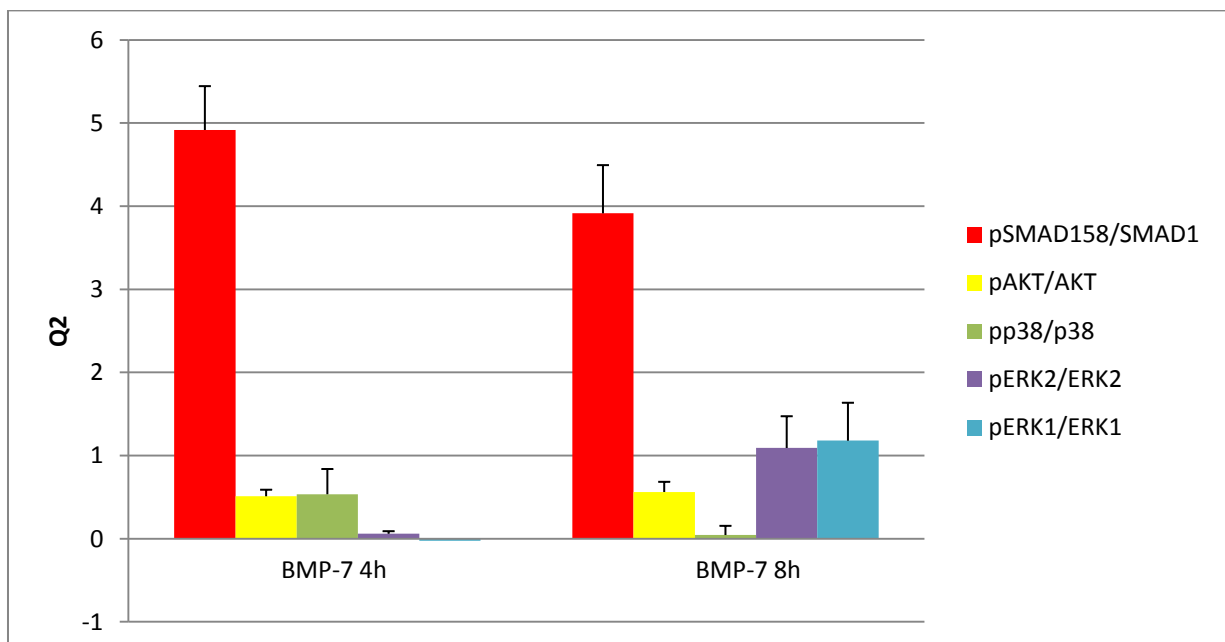


Abbildung 19: Aktivierung der verschiedenen Signalwege nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-7 für 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Signalübertragungsmoleküle wurden nach Inkubation mit BMP-7 für 4h und 8h durchgeführt (Abbildung 19). Der Quotient aus pSmad158/Smad1 ergab zum ersten Zeitpunkt eine 4,8fache Steigerung der Induktion von pSmad1/5/8 gegenüber der serumfreien Kontrolle. Nach einem weiteren Intervall von 4 Stunden ergab sich eine Abnahme der Induktion auf das 3,8fache gegenüber „Serumfrei“. Die Betrachtung der weiteren zytoplasmatischen Transduktionswege ergab keine signifikanten Veränderungen. Die ERK1/2-MAP-Kinase zeigte eine schwache Steigerung der Aktivität nach 8h.

5.3. Zusammenfassung der BMP-Modulation intrazellulär

Die Wirkung der BMPs auf intrazelluläre Prozesse stand im Vordergrund der bisherigen Untersuchungen. Zu den festgelegten Zeitpunkten von 4h und 8h wurde das Zellverhalten mittels Expressionsanalysen auf mRNA Ebene und anschließend auf Proteinebene mittels Western Blot betrachtet. Unabhängig voneinander wurden aus mindestens drei Experimenten die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen berechnet und in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die Inkubationsbedingungen waren immer identisch. β -Aktin wurde bei allen Proben als Housekeeping-Gen bzw. -Protein zur exakten Standardisierung der Vergleichbarkeit und Qualitätskontrolle des Probenmaterials verwendet. Durch diese Vielzahl an Faktoren zur Optimierung und experimentellen Auswertung wurde eine möglichst hohe Validität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich in den bisherigen Versuchen Abweichungen der Expression ausgesuchter Gene und intrazellulärer Signalmoleküle fanden. Auf nukleärer Ebene kam es zu zeitabhängigen Veränderungen, die verdeutlichen, dass eine kürzere Inkubationsdauer der BMPs eine verstärkte mRNA-Transkription bewirkt. Abgesehen von BMP-7 und Noggin wiesen alle untersuchten Gene eine hohe Sensitivität gegenüber den BMPs nach 4-stündiger Inkubation auf. Extrazelluläres BMP-2, -6, und -7 schienen einen ausgeprägten Einfluss auf die Genexpression zu haben, während BMP-3 und seine Mutanten einzig die BMP-7-mRNA zu steigern vermochten. Die Transkription der BMP-7- und Noggin-mRNA wurde erst nach langer Inkubationsphase von 8h induziert.

Weiterhin wurde deutlich, dass alle ausgewählten BMPs, mit Ausnahme von BMP-3 I und BMP-3 Sm04 die Smad-Signaltransduktion zeitlich unabhängig auslösten (Abbildung 20). Am

ausgeprägtesten war der Effekt von BMP-6, gefolgt von BMP-2. Eine verlängerte Inkubationsdauer von 8 Stunden erbrachte mit Ausnahme von BMP-3 Sm04 bei allen BMPs einen Abfall der Induktion der Smad-Proteine. Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-6 führte zusätzlich zu einem Anstieg der phosphorylierten Form AKT nach 4h, deutlicher sogar nach 8h (Abbildung 21). Dies deutet auf einen BMP-6 abhängigen Regulationsmechanismus der AKT-Aktivität hin. BMP-6 scheint also eine weitere Möglichkeit zu besitzen, intrazelluläre Modifikationen der Mammakarzinomzelle MCF-7 zu bewirken.

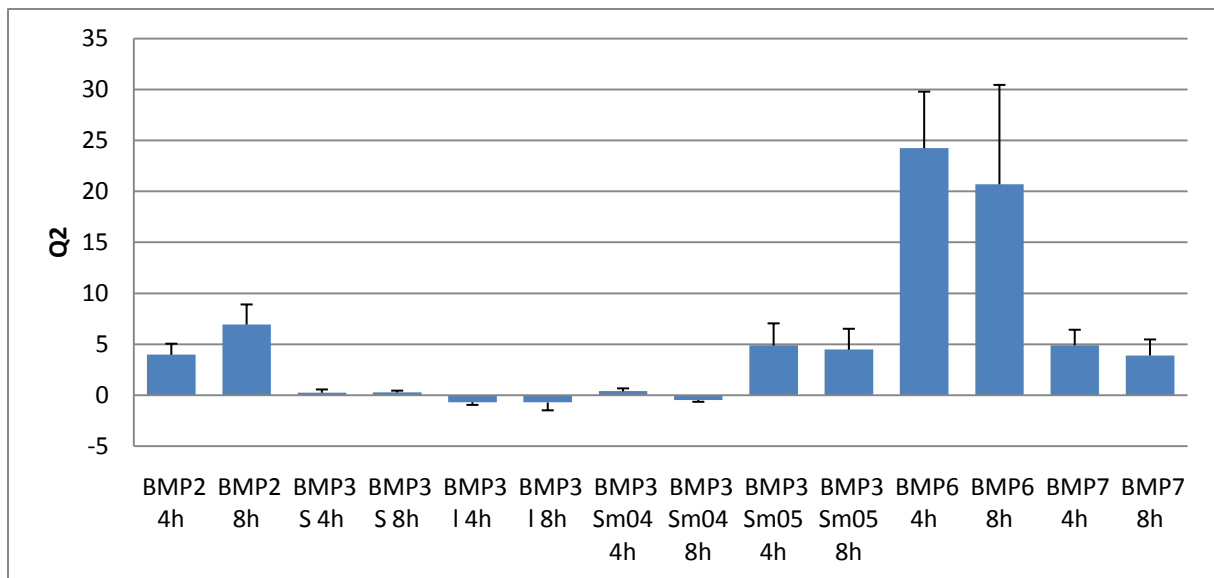


Abbildung 20: Aktivierung des Smad-Signalweges durch die verschiedenen BMPs unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollen und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

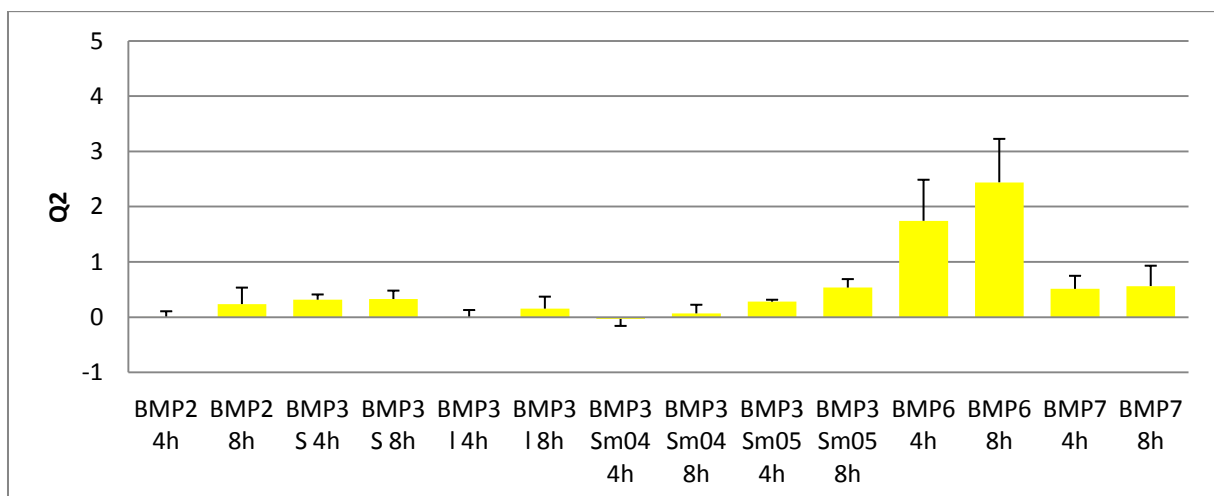


Abbildung 21: Aktivierung des AKT-Signalweges durch die verschiedenen BMPs unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollen und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene spielte die Inkubationsdauer eine entscheidende Rolle. Je länger die Inkubation der BMPs währte, desto schwächer zeigten sich der intrazelluläre Effekt und damit die Modifikation des Zellverhaltens.

Neben den BMPs sind Noggin und eD ALK-3 wichtige Komponenten der Zellmodulation. Diese wurden im Anschluss untersucht.

5.4. Effekte von Noggin

Noggin stellt einen exogenen Antagonisten der BMPs dar. Es inhibiert BMP-Signale durch Blockierung der molekularen Schnittstelle von Bindungssepitopen des Typ-I- und Typ-II-Rezeptors (Groppe et al. 2002).

5.4.1. Effekte von Noggin auf m-RNA Ebene

Nach Inkubation mit je 100nM Noggin fand sich auf mRNA-Ebene bei sechs von sieben ausgewählten Genen keine verstärkte Expression (Abbildung 22). Einzig das Gen BMP-2 zeigte zum ersten Zeitpunkt eine Induktion der Transkription auf das 2fache gegenüber serumfreier Kontrolle. Alle weiteren untersuchten Gene wurden durch Noggin gehemmt. Mit Verlängerung der Inkubationszeit verstärkte sich diese Inhibition zunehmend. Dies kann gut mit der antagonistischen Wirkung des Noggins auf MCF-7 Zellen begründet werden.

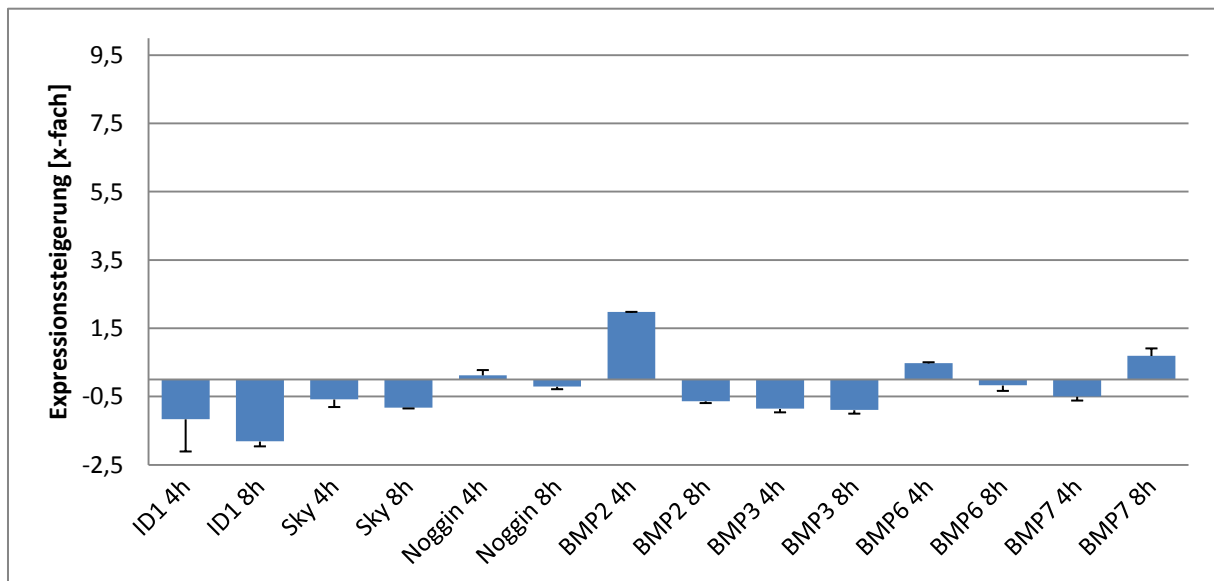


Abbildung 22: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4- und 8-stündiger Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM Noggin nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

5.4.2. Effekte von Noggin auf die intrazelluläre Signaltransduktion

Im Western Blot wurden analog der BMP-Untersuchungen Inkubationsversuche mit 100nM vorgenommen, wobei sich herausstellte, dass es unabhängig von der Inkubationsdauer zu einer extrazellulären Hemmung der Rezeptoraktivierung kam, wodurch weder der Smad- noch der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert wurde.

Im Gegensatz dazu zeigten sich nach längerer Inkubation eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT um den Faktor 2,8, was für die Existenz spricht, dass es trotz antagonistischer BMP-Wirkung von Noggin Transduktionsproteine wie AKT gibt, die aktiviert werden. Abbildung 23 soll dies verdeutlichen.

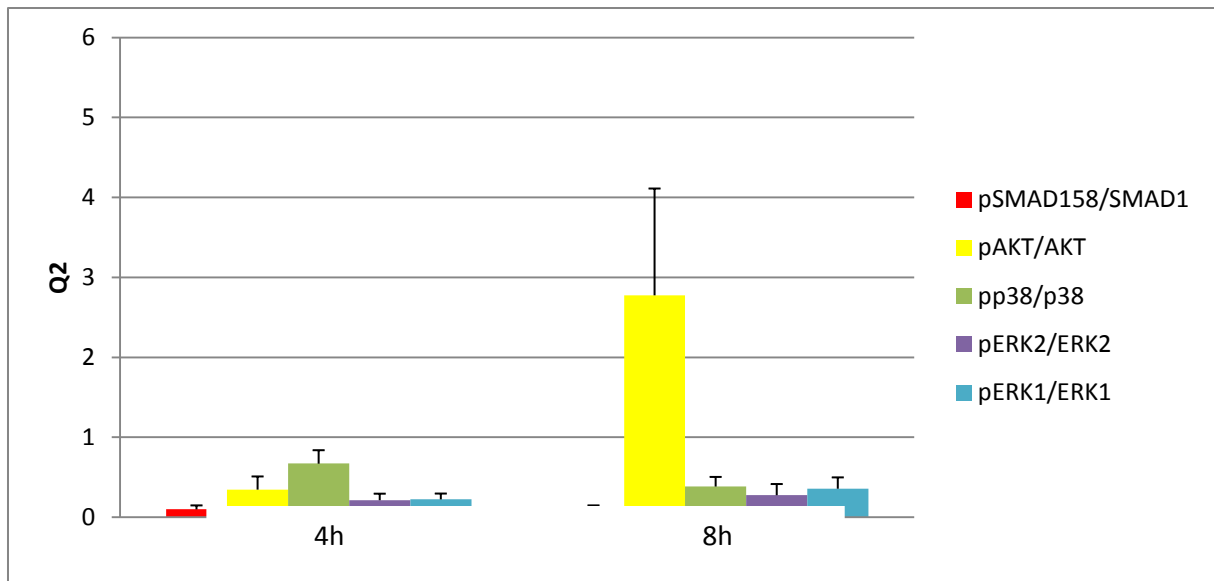


Abbildung 23: Aktivierung verschiedener Signalwege nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit Noggin 100nM für 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

5.5. Effekte von eD ALK-3

TGF- β Signale transduzieren über die extrazelluläre Domäne ALK-3 (Synonym BMPR-Typ IA) intrazelluläre Regulatoren wie Smad1/5/8 und lösen so den Smad-Signalweg zur Modulation der Zelle aus, um biologische Prozesse zu steuern. Einige ALKs sind auch an Dysregulationen wie Tumorgenese, hämorrhagischer Teleangiektasie (HHT), immunologischen und renalen Erkrankungen beteiligt (Graham und Peng 2006). Anhand der MCF-7 Zelllinie sollte der Einfluss auf die Tumorprogression untersucht werden.

5.5.1. Effekte von eD ALK-3 auf mRNA Ebene

Auf mRNA Ebene zeichneten sich deutliche Trends ab. Je kürzer das Zeitintervall der eD ALK-3-Inkubation, desto stärker war die Aktivierung der Expression. Bis auf die BMP-7- und Sky mRNA, wo keine Veränderungen festzustellen waren, konnte bei allen anderen Genen nach 4stündiger Inkubation eine Steigerung der Expression um den Faktor 1,8 bis 3,6 gegenüber „Serumfrei“ nachgewiesen werden. Den deutlichsten Anstieg erbrachte BMP-2, mit knapp 59facher Steigerung gegenüber serumfreier Kontrolle zum ersten Zeitpunkt. Die Gene ID-1,

Noggin und BMP-6 zeigten eine eher schwache Expression. Die 8stündige Inkubation mit eD ALK-3 konnte mit Ausnahme einer 2,1fachen Erhöhung der BMP-3-mRNA keine weiteren signifikanten Modulationen im Zellkern bewirken (Abbildung 24). Die BMP-7-mRNA zeigte sich insgesamt unverändert.

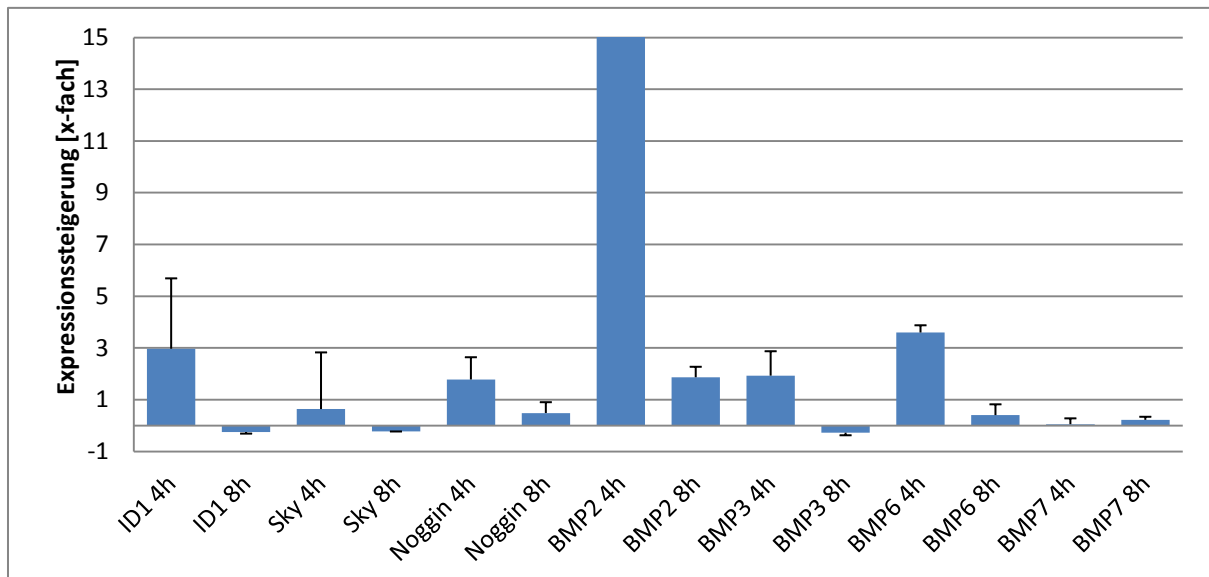


Abbildung 24: mRNA Expression ausgewählter Gene nach 4- und 8-stündiger Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM eD ALK-3 nach semiquantitativer RT-PCR. Die Werte wurden mit der serumfreien Kontrolle verrechnet. (n=3)

5.5.2. Effekte von eD ALK-3 und eD ALK-3 + BMP-2 auf die Induktion verschiedener Signaltransduktionswege

Die extrazelluläre Domäne ALK-3 (eD ALK-3) als Vertreter der Typ-I-Rezeptoren sollte eigenständig sowie in Kombination mit BMP-2 betrachtet werden. Die Inkubationsbedingungen wurden nicht variiert. Analog zu den vorhergehenden Experimenten wurden je 100nM Protein eingesetzt. Mit dem Einsatz von eD ALK-3 zeigte sich unabhängig von der Zeit kein Anstieg der Expression von pSMAD1/5/8, pp38-MAP-Kinase oder pERK1/2 (p44/42). Dagegen führte die Inkubation der MCF-7 Zellen mit eD ALK-3 nach 4h und 8h zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von AKT auf das 1,8 bis 2fache gegenüber „Serumfrei“ (Abbildung 25).

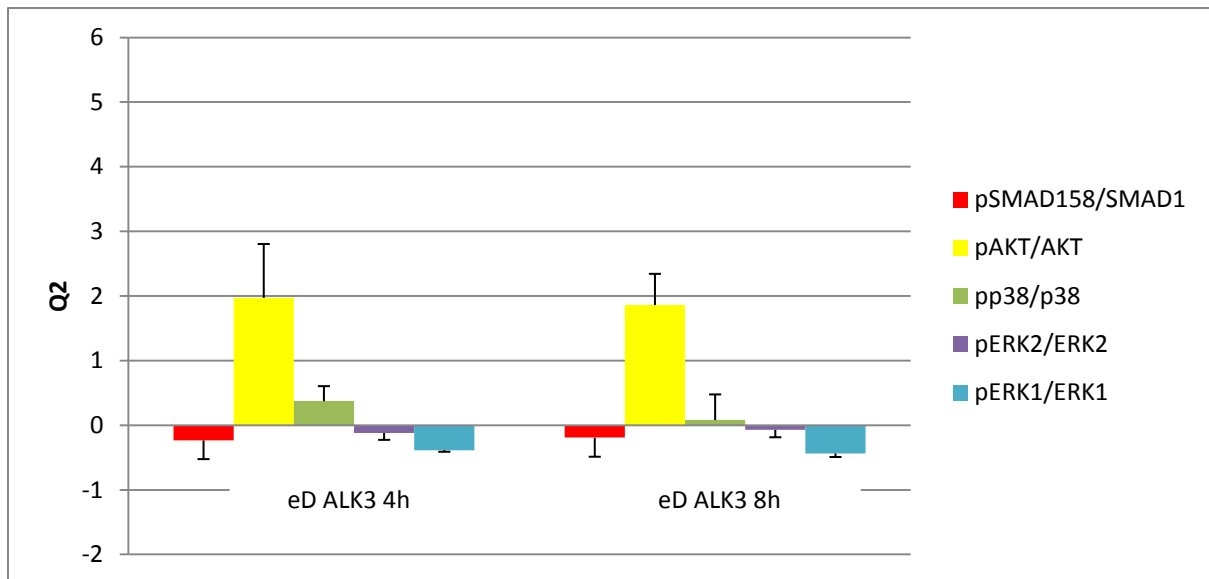


Abbildung 25: Aktivierung verschiedener Signalwege nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit eD ALK-3 für 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin.
 $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Die zeitgleiche Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 und 100nM eD ALK-3 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 ergab abweichende Ergebnisse. Zytoplasmatisches phosphoryliertes AKT wurde nach 4h mit einer 2fachen Erhöhung gegenüber „Serumfrei“ vermehrt nachgewiesen, was dem Ergebnis ohne zusätzliches BMP-2 entspricht. Nach 8h zeigte sich eine schwächere Phosphorylierung. Der Smad-Signalweg wurde durch das zugeführte BMP-2 aktiviert. Es zeigte sich eine Phosphorylierungssteigerung von pSmad1/5/8 über beide Zeitpunkte auf den Faktor 30 gegenüber „Serumfrei“. Der MAP-Kinase-Signalweg blieb zeitunabhängig unverändert (Abbildung 26).

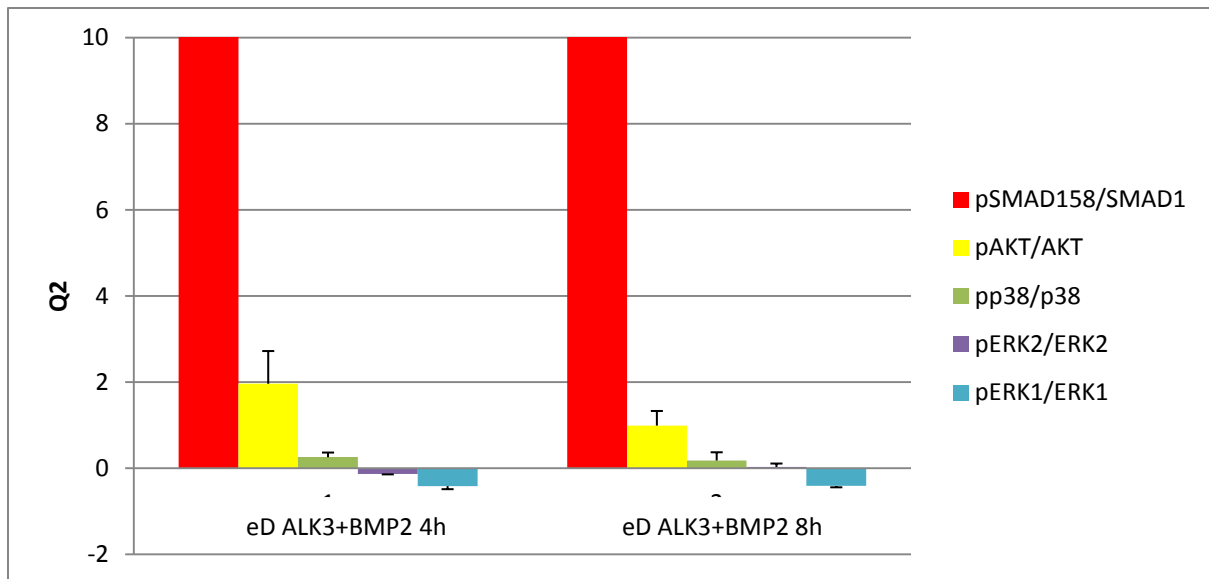


Abbildung 26: Aktivierung verschiedener Signalwege nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit eD ALK-3 + BMP-2 je 100nM für 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrollwerte und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der eD ALK-3 Inkubation, dass die MCF-7 Zellen auf dem AKT-Signalweg mit und ohne BMP-2 Zusatz temporär beeinflusst werden, die Smad-Kaskade aber ausschließlich in Verbindung mit BMP-2 einer Phosphorylierung unterliegt.

5.6. Auswirkungen der Konzentrationsänderung bei ausgewählten BMPs und eD ALK-3

Die bisherigen Ergebnisse geben eine Vorstellung, inwiefern einzelne BMPs intrazellulär sowohl auf Protein- als auch auf Genebene zeitabhängige Modifikationen auslösen. Fraglich ist, ob es Konsequenzen im Verhalten der Zellen aufgrund einer Konzentrationsänderung und Beibehaltung der festgelegten Zeitpunkte gibt. Dafür wurden exemplarisch Konzentrationsbestimmungen von BMP-2, BMP-6 und eD ALK-3 alleine und mit BMP-2 durchgeführt. Im Western Blot wurden die Auswirkungen auf die intrazellulären Signaltransduktionswege Smad und AKT bestimmt. Auf Genebene wurden anhand eD ALK-3 und BMP-2 Betrachtungen angestellt.

5.6.1. Konzentrationsabhängige Induktion der Smad1/5/8-Phosphorylierung durch BMP-2

Die Induktionswirkung von BMP-2 (100nM) konnte in den vorhergehenden Western Blot-Experimenten gezeigt werden. Während beider definierter Zeitpunkte von 4h und 8h der Inkubation kam es zu signifikanten Anstiegen der Phosphorylierung von Smad1/5/8, was für die Auslösung der Signalkaskade durch BMP-2 spricht.

Nun wurden Experimente mit einer Konzentration von 1/10 der Standardkonzentration, also 10nM, vorgenommen. Es zeigten sich interessanterweise ähnliche Muster, nach beiden Inkubationszeiten kam es zur Zunahme von phosphoryliertem Smad1/5/8. Nach 4stündiger Applikation von extrazellulärem BMP-2 erhöhte sich die Phosphorylierung bereits um Faktor 2,1, nach 8 Stunden um Faktor 4 gegenüber der serumfreien Kontrolle. Im Vergleich zur Inkubation mit 100nM BMP-2 (Abbildung 27) zeigten sich geringe Unterschiede. Zum ersten Zeitpunkt bewirkte die Konzentration von 10nM eine geringere Induktion, zum zweiten Zeitpunkt konnten die 10nM BMP-2 eine deutlichere Induktion umsetzen. BMP-2 10nM und 100nM verhielten sich zeitlich ähnlich, beide Konzentrationsuntersuchungen konnten eine signifikante Verstärkung der Phosphorylierung auslösen und dadurch den Signalweg induzieren. Die Grafik zeigt das der Western Blot-Banden-Darstellung entsprechende Bild (Abbildung 27 und 28). Die für den Antikörper pSmad1/5/8 entsprechende Bande bei 60 kDa konnte für beide Konzentrationen BMP-2 4h und 8h sichtbar gemacht werden, während die serumfreie Kontrolle keine Bande zeigte, was dafür spricht, dass eine Inkubation ohne Knochendomorphogenesefaktor den Smad-Signalweg nicht induzierte. Die serumfreie Inkubation konnte somit als Kontrolle der BMP-Wirkung genutzt werden.

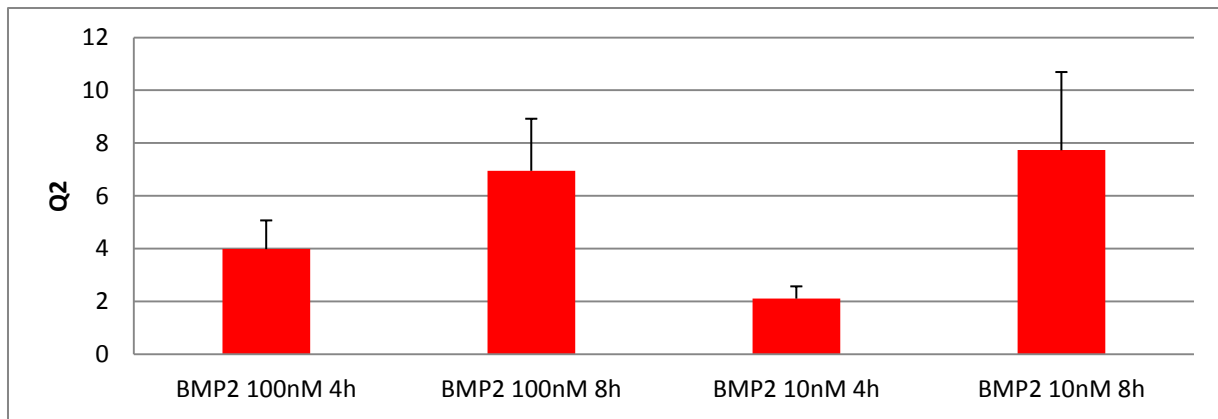


Abbildung 27: konzentrationsabhängige Modulation der Signaltransduktion von pSmad158/Smad1 nach 4h und 8h im Western Blot. Alle Werte beziehen sich auf die serumfreie Kontrolle und β -Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1/\text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

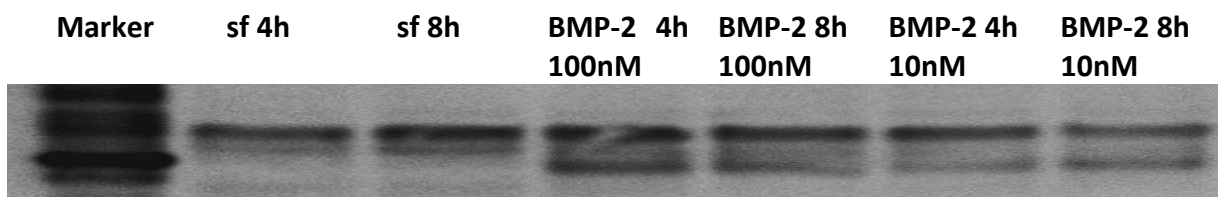


Abbildung 28: Western Blot Darstellung von pSmad1/5/8. Die unterste Bande entspricht der Proteingröße des phosphorylierten Smad-Antikörpers. Die serumfreie Kontrolle (sf) zeigt keine Banden in dem zu beurteilenden Proteingrößenbereich und dient als Negativkontrolle.

5.6.2. Konzentrationsabhängige Induktion der Smad1/5/8-Phosphorylierung durch BMP-6

Aufgrund der Ergebnisse mit BMP-2 wurde nun BMP-6 untersucht. Die Konzentrationen von 10nM und 200nM wurden im Vergleich zur Standardkonzentration von 100nM analysiert. Nach densitometrischer Auswertung der Western Blot Banden zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Induktion der Phosphorylierung von pSmad158/Smad1. 10nM BMP-6 löste eine im Vergleich zur Standardkonzentration geringe Aktivierung von pSmad1/5/8 aus, die Werte lagen zwischen Faktor 2,6 und 6,6 über der

serumfreien Kontrolle, wobei nach 4 Stunden ein stärkerer Effekt ersichtlich wurde. Auch die Inkubation von 200nM BMP-6 führte nach 4 Stunden zur Induktion des Smad-Signalweges, nach 8 Stunden war jedoch eine Abschwächung messbar. Wieder sanken die Werte im Vergleich zur Standardmenge um mehr als ein Fünftel.

Somit konnte festgestellt werden, dass die Variation der BMP-6-Konzentration nach dem ersten definierten Zeitpunkt von 4h immer eine Induktion der Phosphorylierung der pSmad1/5/8-Proteine bewirkte, wobei die Standardkonzentration von 100nM den deutlichsten Effekt zeigte. Nach 8h veränderte sich die Intensität der Aktivierung, so dass bei 10% der Menge an BMP-6 noch eine Steigerung stattfand, die doppelte Konzentration aber ein negatives Ergebnis erbrachte. Jedoch zeigte sich eine Tendenz: Bei allen Messungen bewirkte eine verlängerte Expositionsdauer einen Abfall der pSmad1/5/8-Aktivierung (Abbildung 29).

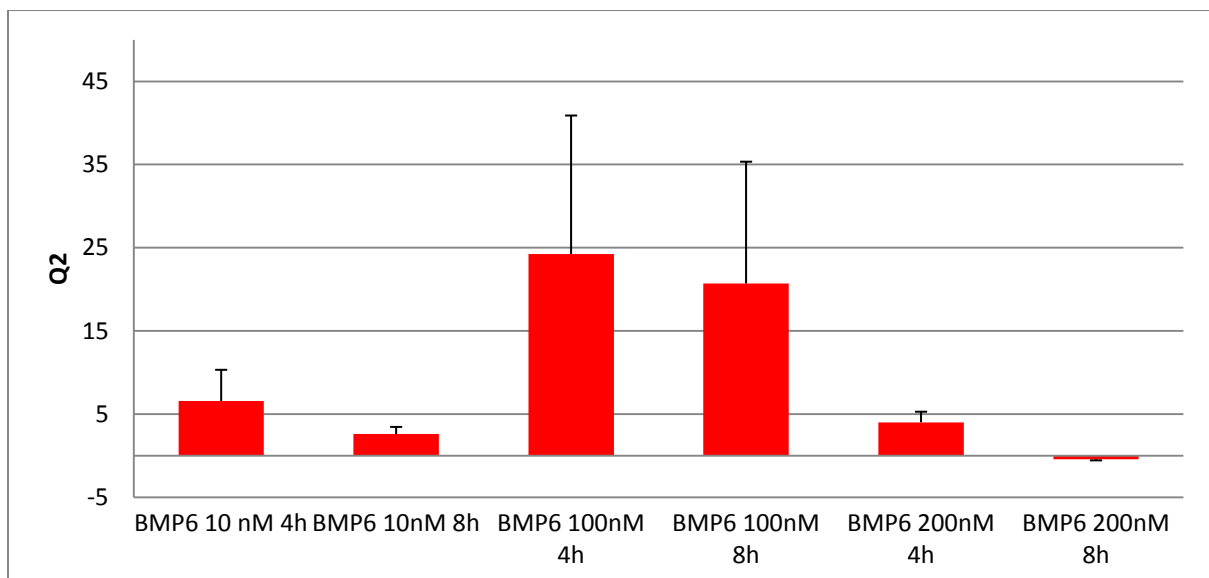


Abbildung 29: Anstieg der Aktivität von pSmad158/Smad 1 im Western Blot ausgewählter Konzentrationen von BMP-6. Alle Werte beziehen sich auf die serumfreie Kontrolle und β -Aktin. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1 / \text{Kontrolle serumfrei}$; (n=2)

5.6.3. Konzentrationsabhängige Aktivierung der AKT-Phosphorylierung durch BMP-6

Da es durch die extrazelluläre Präsenz von BMP-6 und BMP-2 zu einer intrazellulären Aktivierung des Smad-Signalweges kam, wurde weiterhin der AKT-Signalweg betrachtet. Die Western Blot Auswertung in Abbildung 30 zeigt bei allen Inkubationsversuchen eine schwache Induktion der Proteinphosphorylierung, wobei die doppelte Konzentration von BMP-6 (200nM) eine geringere pAKT/AKT-Modulation bewirkte. Gegenüber der Standardkonzentration von 100nM, bei der eine 1,7 fache Erhöhung des pAKT-Anteils gegenüber der serumfreien Kontrolle ermittelt wurde, ergab sich bei Einsatz der doppelten Menge BMP-6 nach 4 Stunden Inkubation keine nennenswerte Induktion. Nach 8 Stunden stiegen die Werte auf 1,3 gegenüber „Serumfrei“ an, lagen aber nicht im für die Arbeit festgelegten Signifikanzbereich von über 1,5. In der densitometrischen Auswertung der Western Blot- Banden (Abbildung 31) zeigten die serumfreie Kontrolle und BMP-6 (200nM) phosphorylierte AKT-Proteine in vergleichbarer Intensität. Die Konzentrationserhöhung auf das Doppelte löste keine zytoplasmatische Induktion der Transduktion aus. Die Standardkonzentration von 100nM BMP-6 hingegen aktivierte den Transduktionsweg durch Phosphorylierung. Darüber hinaus zeigte sich eine zeitliche Korrelation. Je länger die Inkubationsdauer, desto stärker war die BMP-6 regulierte Aktivierung der pAKT-Proteine. Zusammenfassend zeigten sich sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige Veränderungen der endogenen AKT-Transduktionswege nach BMP-6-Gabe.

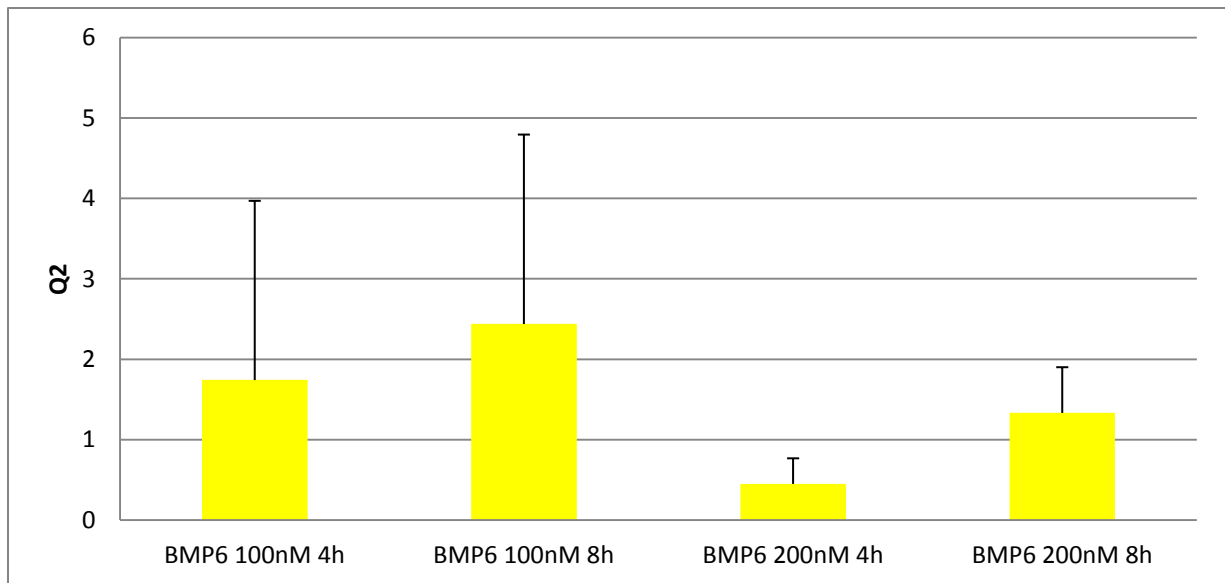


Abbildung 30: Anstieg der Aktivität von pAKT/AKT im Western Blot ausgewählter Konzentrationen von BMP-6. Alle Werte beziehen sich auf die serumfreie Kontrolle und β -Aktin.

Q1=phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; Q2=Q1/Kontrolle serumfrei; (n=3)

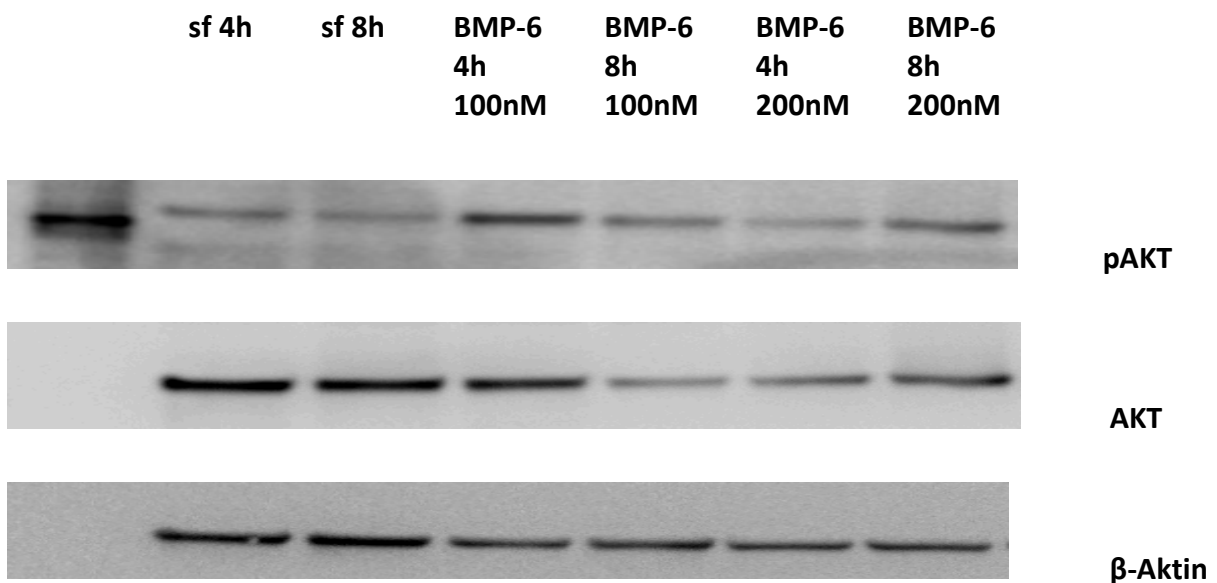


Abbildung 31: Western Blot Darstellung der Banden pAKT, Akt und der Kontrolle β -Aktin nach 4h und 8h Inkubation der MCF-7 Zellen mit BMP-6 100nM und 200nM.

5.6.4. Konzentrationsabhängige Aktivierung der AKT- und Smad1/5/8-Phosphorylierung durch eD ALK-3 und eD ALK-3 mit BMP-2

Die extrazelluläre Domäne der BMP-Typ-I-Rezeptor-Kinase ALK-3 war neben den BMPs Gegenstand der Untersuchungen. Das Balkendiagramm in Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Proteinanalysen mit eD ALK-3 100nM und eD ALK-3 200nM. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, die eD ALK-3 und BMP-2 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 mit Konzentrationen 100nM und 200nM als Inkubationsmedium verwendeten. Alle Werte wurden mit der Negativkontrolle „Serumfrei“ korreliert und mit β -Aktin verglichen.

Bei der densitometrischen Auswertung der Banden zeigte sich eine Hochregulierung der pAKT-Proteine um das Zweifache gegenüber serumfreier Kontrolle. Über die Zeit kam es zu einem Abfall unter eD ALK-3 + BMP-2, so dass die AKT-Phosphorylierung um die Hälfte sank. Mit Zugabe der doppelten Konzentration an eD ALK-3 und BMP-2 kam es zur Hemmung des endogenen Transduktionsweges. Eine Verdopplung beider externen Proteine auf 200nM führte eher zur schwächeren Induktion im Vergleich zu 100nM und verringerte sich weiter nach längerer Exposition. Demgegenüber erfolgte eine starke Aktivierung der pSmad1/5/8-Proteine um das 34fache gegenüber dem serumfreien Wert. Somit konnte die Zugabe von BMP-2 und eD ALK-3 den Akt-Signalweg nicht verstärken, aber eine Aktivierung des Smad-Signalweges durch Phosphorylierung von Smad1/5/8 auslösen (Abbildung 32).

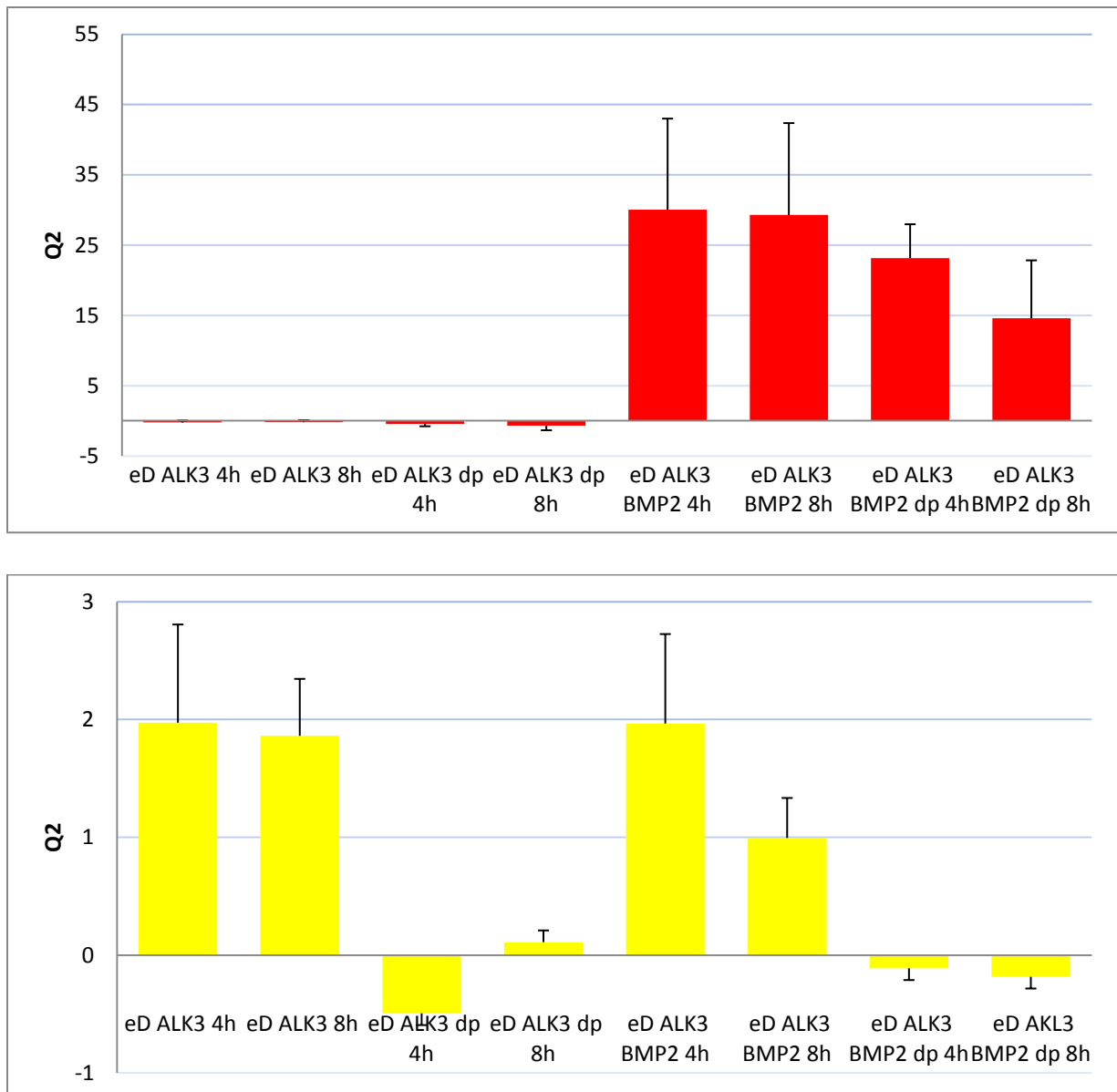


Abbildung 32: Expressionsanalysen von pSmad/Smad (rot) und pAKT/AKT (gelb). Gegenüberstellung beider Transduktionswege nach Applikation von 100nM eD ALK-3 und eD ALK-3 + BMP-2 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 und der Verdopplung der Konzentration auf 200nM (dp) während beider definierter Zeitpunkte. Alle Werte wurden mit der serumfreien zeitlich übereinstimmenden Kontrolle und β -Aktin verrechnet. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1 / \text{Kontrolle serumfrei}$; (n=2)

5.7. Zusammenfassung der Konzentrationsänderungen

Zusammenfassend wird festgestellt, dass eine Konzentrationsänderung der untersuchten BMPs endogene Modulationen der Signalwege auslöste. Tabelle 5 stellt eine Übersicht dar.

Tabelle 5: Vergleich aus Western Blot-Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen und Zeitpunkten nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit exogen zugeführtem Protein;

rot: Phosphorylierungssteigerung, blau: schwache bis keine Phosphorylierung

Exogenes Protein	Signalweg	Standardkonzentration von 100nM		Konzentration 10nM		Konzentration 200nM	
		4h	8h	4h	8h	4h	8h
BMP-2	pSmad158/Smad1	3,99	6,96	2,11	7,73		
BMP-6	pSmad158/Smad1	24,25	20,71	6,59	2,61	4,03	-0,39
eD ALK-3	pSmad158/Smad1	-0,23	-0,19			-0,44	-0,69
eD ALK-3 + BMP-2	pSmad158/Smad1	30,05	29,28			23,16	14,59
BMP-2	pAKT/AKT	0,003	0,23				
BMP-6	pAKT/AKT	1,74	2,44			0,45	1,33
eD ALK-3	pAKT/AKT	1,97	1,86			-0,49	0,11
eD ALK-3 + BMP-2	pAKT/AKT	1,91	1,02			-0,15	-0,23

Die Standardkonzentration von 100nM BMP zeigte sich auf dem Smad- und AKT-Signalweg als induktionsfördernd, während die 10%ige bzw. die 2fache Menge Differenzen aufwies. BMP-2 zeigte unabhängig von der Konzentration und der Zeit eine Phosphorylierungssteigerung des Smad1/5/8, während BMP-6 konzentrationsunabhängig aber zeitabhängig Einfluss auf den Smad-Signalweg nahm. eD ALK-3 löste dagegen keine Aktivierung von pSmad1/5/8 aus. Die gleichzeitige Inkubation der MCF-7 Zellen mit eD ALK-3 und BMP-2 zeigte wiederum aufgrund der Anwesenheit des BMP-2 konzentrations- und zeitunabhängig eine Induktion von Smad. Die Phosphorylierung der Akt-Proteine konnte nur durch die Standardkonzentration von 100nM ausgelöst werden, die Aktivierungsstärke unterlag aber deutlich der Zeit. Während BMP-6 die Zellen erst nach längerer Inkubationsphase signifikant beeinflusste, konnten eD ALK-3 + BMP-2 schon nach 4h deutliche Effekte zeigen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die BMP-Wirkung zeit- und

konzentrationsabhängig verläuft. Diese divergenten Ergebnisse zeigen, wie komplex die BMP-Wirkung in der Mammakarzinomzelle ist. Es wirft die Fragen auf, inwiefern die Effekte auf andere Zellarten übertragbar sind und ob es sich um direkte oder indirekte Effekte handelt. In weiterführenden Experimenten sollen die individuellen Mechanismen untersucht werden.

5.8. Nachweis phosphorylierter Antikörper mittels Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse aus Western Blot und semiquantitativer RT-PCR zeigten große Unterschiede in der Regulation intrazellulärer Signalwege durch BMPs. Ein geeignetes System zur parallelen Betrachtung von Phosphorylierung und Nichtphosphorylierung der Zellen nach BMP-Induktion stellte die Durchflusszytometrie dar. Ziel war es, eine genauere Aussage bezüglich der Aktivierungsvorgänge von Transduktionswegen im Zytoplasma erbringen und somit die Western Blot-Ergebnisse zu bestätigen.

Für diese quantitative Einzelzellbestimmung wurden die MCF-7 Zellen aus ihrem adhärenenten Zustand in Suspension gebracht und mittels fluoreszierender Antikörper gegen pERK1/2- und pp38-MAP-Kinase multiparametrisch analysiert (s. Methodik). Die Wahl der Antikörper lag darin begründet, dass BMPs an der Regulierung beider Signalwege beteiligt sind und die Antikörper gut etabliert sind. Weitere Antikörper wie pSmad1/5/8 und Smad1 waren zum Zeitpunkt der Messung nicht verfügbar.

5.8.1. Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von PMA

Extrazelluläres Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), ein Phorbolester, wurde zur Induktion der Aktivierung von pERK1/2 der MCF-7 Zelllinie verwendet. PMA verhindert in MCF-7 Zellen das Zellwachstum und stimuliert gleichzeitig das Zellüberleben- beides ERK-abhängig (Fortino et al. 2008). Um diese Ergebnisse zu reproduzieren, wurden zur Inkubation der Zellen über den Zeitraum von 30 Minuten und 4 Stunden 10nM PMA eingesetzt und anschließend im Durchflusszytometer ausgewertet. Zum Nachweis der endogenen

Phosphorylierung wurden fluoreszierende Antikörper gegen pERK1/2- und pp38-MAP-Kinase in einer Menge von 10µl und einer Stammlösung von 50nM eingesetzt. Der pERK1/2-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der phosphoryliertes Threonin 202 und Tyrosin 204 (pT202/pY204) auf humanem ERK1 erkennt und pT184/pY186 auf humanem ERK2 erkennt. Der Antikörper gegen pp38-MAP-Kinase bindet zur Erkennung intrazellulärer Signaltransduktion des p38-MAP-Kinase-Signalweges an die konservierte duale phosphorylierte Stelle pT 180/pY182 von p38-MAP-Kinase 11-14.

Für die Darstellung des PMA-induzierten intrazellulären Signals in Abbildung 27 und 28 wurde ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) aufträgt und so die Beurteilung der intrazellulären Proteinkonzentration von pERK1/2- und pp38-MAP-Kinase in den Zellen ermöglichte. Im PE-Kanal des FACS-Gerätes wurde die Messung von pERK1/2 vorgenommen, im FITC-Kanal die Messung der pp38-MAP-Kinase. Somit konnte eine Unterscheidung der zwei Signalwege vollzogen werden. Die Bindung des Antikörpers gegen pERK1/2 (orange Kurve) konnte durch eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität im Wellenbereich 530/30 um eine Potenz gegenüber der serumfreien Kontrolle (blaue Kurve) nach Zählung von 10.000 Zellen nachgewiesen werden, was die Rechtsverschiebung im linken Histogramm darstellt (Abbildung 33). Dieses Ergebnis spricht für eine erhöhte endogene Aktivierung des ERK-Signalweges. Damit werden Literaturdaten bestätigt, die beschreiben, dass in den MCF-7 Zellen durch externe Stimulation mit PMA intrazelluläres pERK1/2 aktiviert wird (Fortino et al. 2008) und sich so die Zellmorphologie ändert.

Weiterhin wird anhand der Histogramme in Abbildung 33 und 34 deutlich, dass die Zellen nach 30min stärker fluoreszieren, die Phosphorylierung bzw. die Aktivierung von ERK1/2-MAP-Kinase schnell vonstattenging und es nach 4h zur minimalen Abschwächung kommt. Diese Ergebnisse verdeutlichen die zeitliche Abhängigkeit intrazellulärer Modulationen. In der Negativkontrolle (serumfreie Probe) und der Probe mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper pp38-MAP-Kinase kam es zu keiner Aktivierung, so dass die Vermutung bestätigt wurde, dass der Antikörper pp38-MAP-Kinase defekt war.

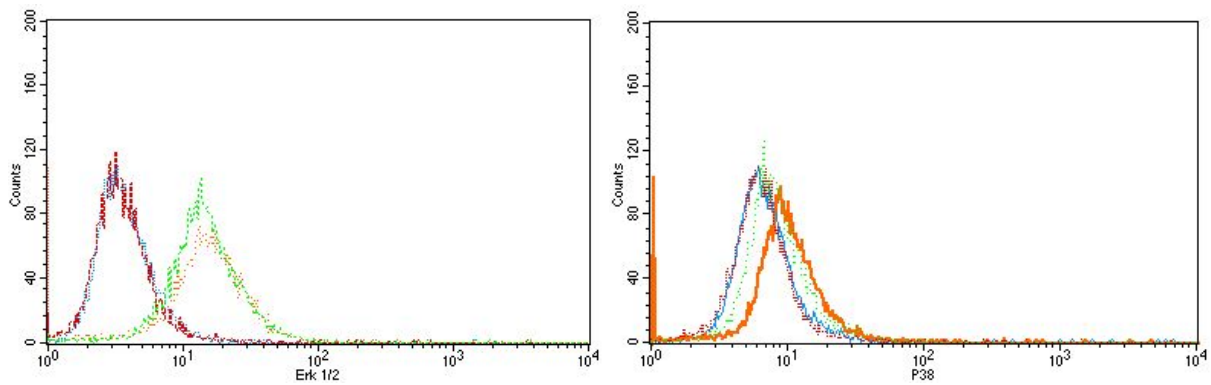


Abbildung 33: Histogramme der Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) nach 30 Minuten Inkubation mit PMA. Das linke Histogramm stellt die Messung im PE-Kanal dar, das rechte Histogramm die Messungen im FITC-Kanal. Blau= serumfreie Kontrolle, Rot= pp38-Antikörper, Grün= pERK1/2 und pp38-Antikörper, Orange= pERK1/2.

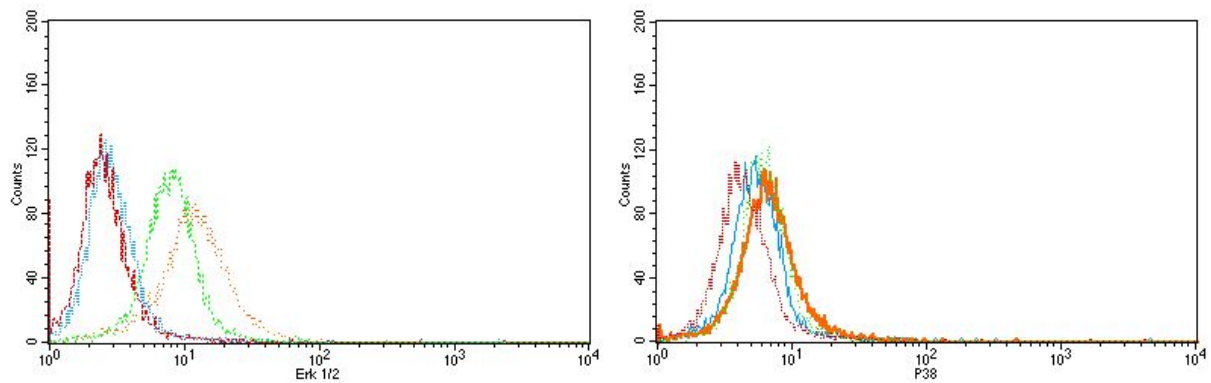


Abbildung 34: Histogramme der Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) nach 4 Stunden Inkubation mit PMA. Das linke Histogramm stellt die Messung im PE-Kanal dar, das rechte Histogramm die Messungen im FITC-Kanal. Blau= serumfreie Kontrolle, Rot= pp38-Antikörper, Grün= pERK1/2 und pp38-Antikörper, Orange= pERK1/2.

Im nächsten Schritt wurden als Untersuchungsvariablen die Konzentration der Antikörper und die Konzentration der Stammlösung über die Zeitpunkte 30min und 4h verglichen. Nach Verdopplung der Antikörpermenge von 10µl auf 20µl und der Stammlösung von 50nM auf 100nM, ergab sich im Histogramm weder eine signifikante Fluoreszenzzu- oder –abnahme. Die Abbildungen 35 und 36 verdeutlichen dies. Weder die Mengenerhöhung der Antikörper, noch die der Stammlösung zu beiden festgelegten Zeitpunkten verstärkten eine endogene Phosphorylierung der Proteine, eine intrazelluläre Modifikation der Signalwege wurde nicht ausgelöst.

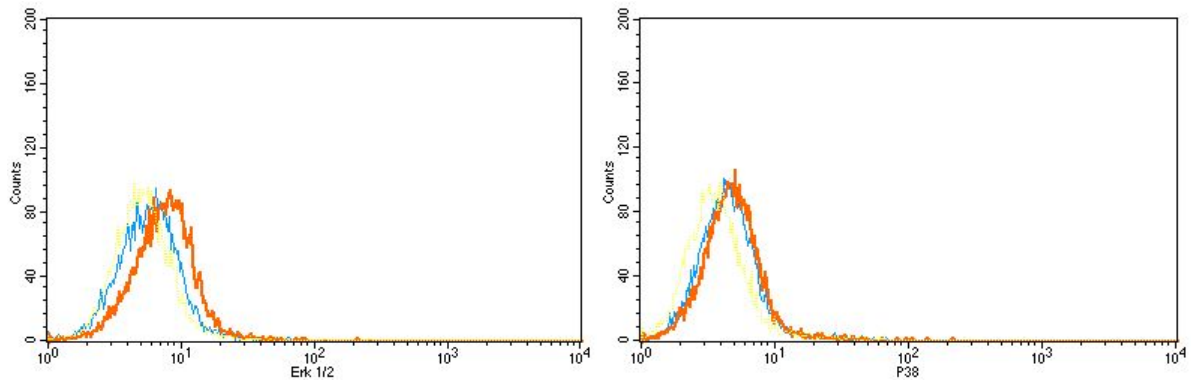


Abbildung 35: Histogramme der Messung der Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) nach 30 min Inkubation mit PMA. Das linke Histogramm stellt die Messung im PE-Kanal dar, das rechte Histogramm die Messungen im FITC-Kanal. Blau= 20µl pERK1/2-MAP-Kinase und pp38-MAP-Kinase, Orange= 10µl pERK1/2-MAP-Kinase und pp38 MAP-Kinase, Gelb= 100nM PMA-Stammlösung mit beiden Antikörpern

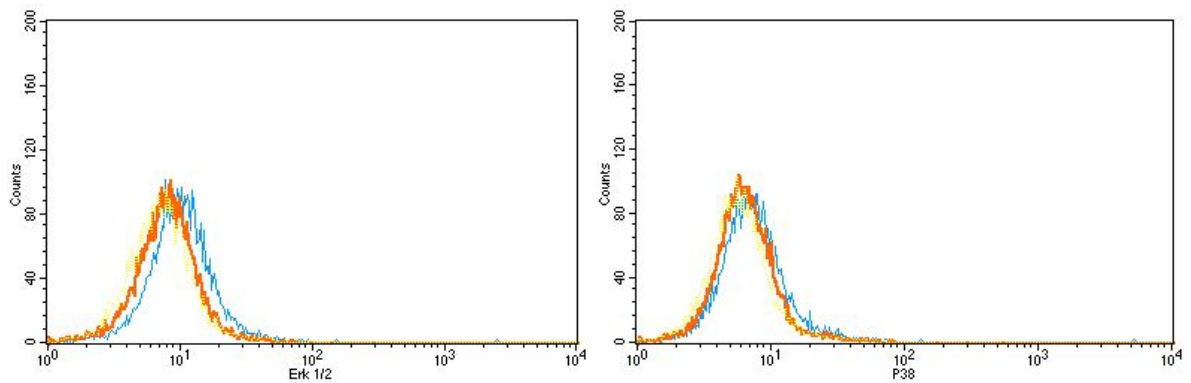


Abbildung 36: Histogramme der Messung der Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) nach 4 Stunden Inkubation mit PMA. Das linke Histogramm stellt die Messung im PE- Kanal dar, das rechte Histogramm die Messungen im FITC-Kanal. Blau= 20µl pERK1/2-MAP-Kinase und pp38-MAP-Kinase, Orange= 10µl pERK1/2-MAP-Kinase und pp38 -MAP-Kinase, Gelb= 100nM PMA-Stammlösung mit beiden Antikörpern

5.8.2. Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von Anisomycin

Eine wichtige Kontrolle für den Nachweis der Aktivierung der MAP-Kinasen war die Inkubation mit Anisomycin. Das Protein Anisomycin reguliert als möglicher Tumorsuppressor prädominant Entzündungs- und Stressantworten der Tumorzellen (Loesch und Chen 2008).

Nach zahlreichen Versuchsreihen und trotz Konzentrationssteigerung des Fluoreszenzmarkers musste festgestellt werden, dass der Alexa Fluor Antikörper pp38-MAP-Kinase aufgrund seiner Inaktivität nicht die erwarteten Ergebnisse lieferte. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Funktionalität überprüft, wobei die Inaktivität der Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse waren nicht verwertbar.

5.8.3. Modulation der Zelle durch extrazelluläre Applikation von BMP-2

In Anlehnung an die vorausgegangenen Untersuchungen von PMA wurde im Folgenden BMP-2 als suppressives wie progressives extrazelluläres Protein in der Tumorgenese konzentrationsabhängig überprüft. Die 2- und 4-stündige Inkubation der Zellen mit 50nM und 100nM BMP-2 ohne weitere Zugabe fluoreszierender Antikörper zeigte keine konzentrationsabhängigen Unterschiede (Abbildung 37 und 38). Somit wurde die Standardkonzentration von 100nM wie in den Westen Blot Untersuchungen beibehalten und für die folgenden Versuche eingesetzt

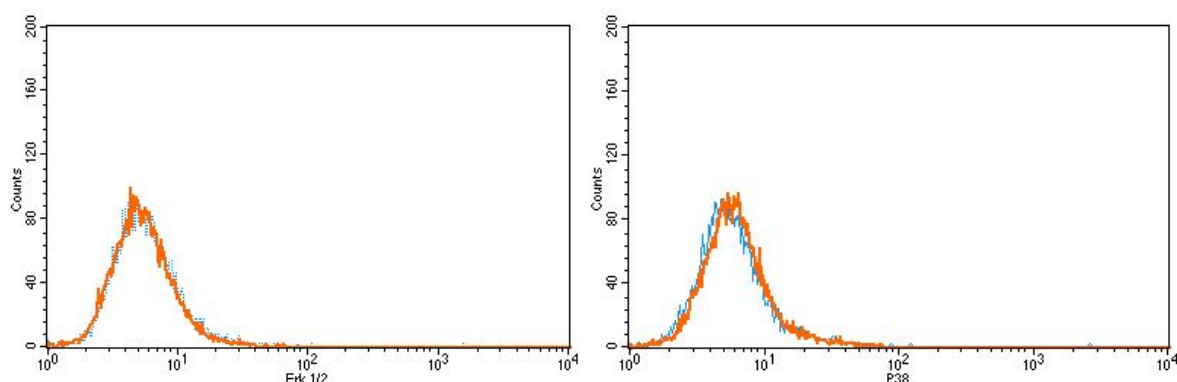


Abbildung 37: Histogramme zur Darstellung der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzänderung nach 2 Stunden Inkubation der MCF-7 Zellen mit 50nM BMP-2 und 100nM BMP-2 im PE (ERK)-Kanal links und im FITC (p38)-Kanal rechts ohne Antikörper. Blau=50nM BMP-2, orange=100nM BMP-2

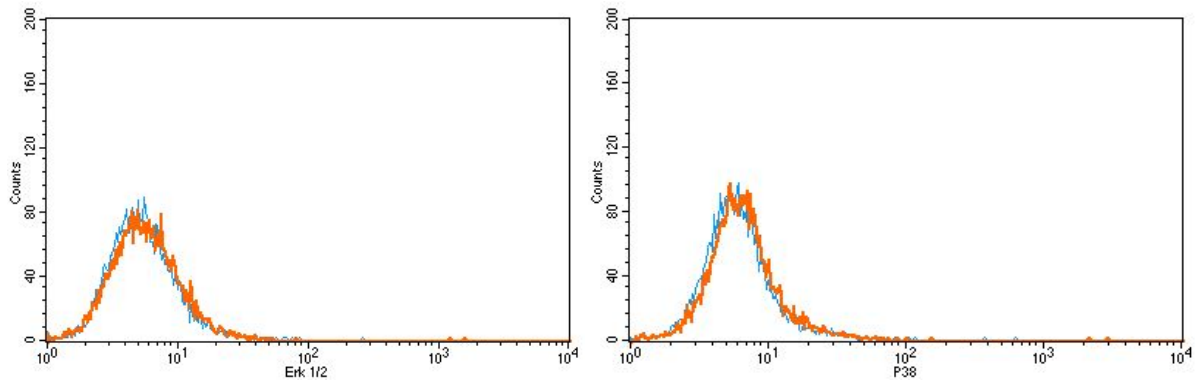


Abbildung 38: Histogramme zur Darstellung der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzänderung nach 4 Stunden Inkubation der MCF-7 Zellen mit 50nM BMP-2 und 100nM BMP-2 im PE (ERK)-Kanal links und im FITC (p38)-Kanal rechts ohne Antikörper. Blau= 50nM BMP-2, orange= 100nM BMP-2

Die Inkubation der Zellen mit 100nM BMP-2 über 30min und 4h erbrachte hingegen Differenzen. Wie in Abbildung 39 und 40 zu erkennen, induzierte eine 30minütige Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 eine Aktivierung von ERK1/2 gegenüber der serumfreien Kontrolle ohne Antikörper. Im PE-Kanal (ERK1/2) zeigte sich eine Rechtsverschiebung und somit Fluoreszenzzunahme um eine halbe Zehner-Potenz. Im FITC-Kanal (p38) dagegen konnte keine Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase festgestellt werden. Nach 4stündiger BMP-2-Inkubation zeigte sich eine noch stärkere Aktivierung des ERK1/2-Signalweges, was durch Rechtsverschiebung bzw. Fluoreszenzsteigerung (x-Achse) zum Ausdruck kommt. Die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase wurde zeitlich abhängig hochreguliert. Die zeitgleiche Applikation von beiden fluoreszenzmarkierten Antikörpern (pp38-MAP-Kinase und pERK1/2-MAP-Kinase) im Verhältnis 1:1 (grüne Kurve) erwies die gleiche Fluoreszenzverstärkung wie die alleinige Inkubation mit pERK1/2-MAP-Kinase, die Begründung liegt in der Inaktivität des pp38-MAP-Kinase-Antikörpers. Die Fluoreszenzzunahme ist einzig auf den pERK1/2-MAP-Kinase-Antikörper zurückzuführen, wodurch die Überlagerung der Kurven orange und grün nach 30min Inkubation begründet liegt. Nach 4h war eine erhöhte Aktivität des ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweges nachweisbar.

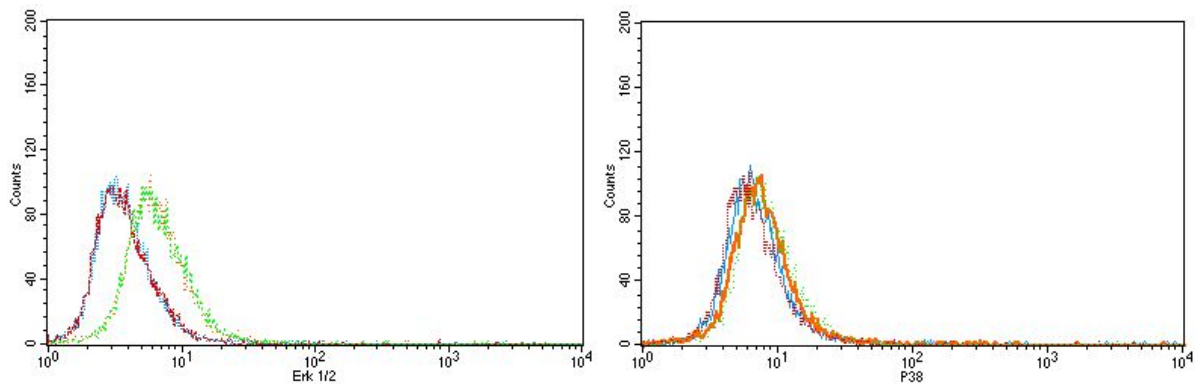


Abbildung 39: Histogramme der Fluoreszenzintensität (x-Achse) nach 30 min Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 zur Bestimmung des intrazellulären pERK1/2. Vergleich PE-Kanal-Messung links gegen FITC-Kanal-Messung rechts. Blau= serumfreie Kontrolle, orange= pERK1/2, lila= pp38-MAP-Kinase, grün= pERK1/2 und pp38-MAP-Kinase-Antikörper

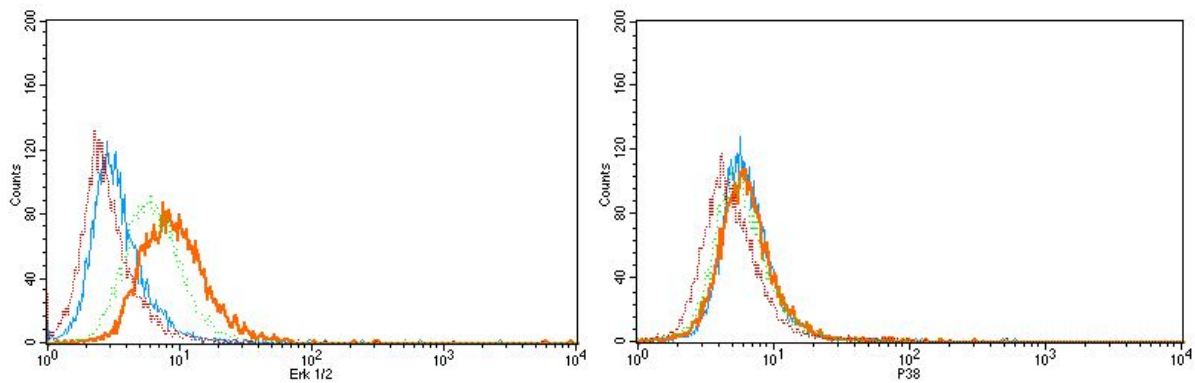


Abbildung 40: Histogramme zur Darstellung der Fluoreszenzintensität (x-Achse) nach 4 Stunden Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 zur Bestimmung des intrazellulären pERK1/2. Vergleich PE-Kanal-Messung linkes Bild gegen FITC-Kanal-Messung rechtes Bild. Blau= serumfreie Kontrolle, orange= pERK1/2, Lila= pp38-MAP-Kinase, grün= pERK1/2 und pp38-MAP-Kinase-Antikörper

Anhand der durchflusszytometrischen Experimente konnten gezeigt werden, dass BMP-2 die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine des ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweges induziert. Diese Ergebnisse sind nicht identisch mit den Western Blot-Analysen. In der FACS-Analyse konnte eine BMP-induzierte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges nachgewiesen werden, während in der Western Blot-Auswertung keine Aktivierung zu detektieren war.

Zur Verdeutlichung des positiven Einflusses der verschiedenen Inkubationsmedien soll die folgende Abbildung 41 illustrieren, dass PMA und BMP-2 die Phosphorylierung der endogenen ERK1/2-MAP-Kinase aktivieren, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Während BMP-2 unabhängig von der Konzentration eine um eine halbe Zehner-Potenz verstärkte

Fluoreszenzintensität gegenüber „Serumfrei“ bewirkte, konnte PMA eine Verstärkung von einer Zehner-Potenz gegenüber „Serumfrei“ auslösen.

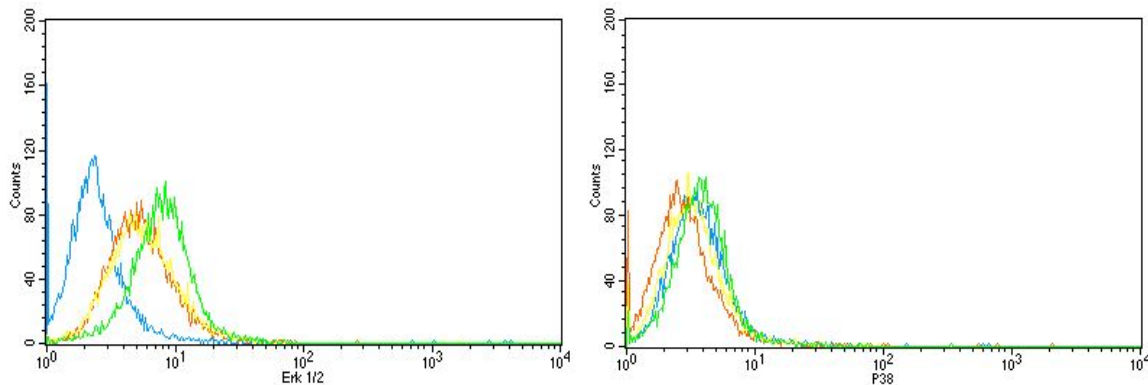


Abbildung 41: Histogramme zum Vergleich der Phosphorylierungssteigerung nach Inkubation mit der serumfreien Kontrolle (blau), BMP-2 50nM (orange), BMP-2 100nM (gelb) und PMA (grün). Vergleich PE-Kanal-Messung (ERK) links gegen FITC- Kanal-Messung (p38) rechts.

5.8.4. Validierung der Durchflusszytometrie-Daten anhand von Western Blot-Untersuchungen

Ergänzend zur FACS-Analyse wurden Western Blot-Untersuchungen vorgenommen, die die ermittelten Ergebnisse bestätigen sollten. Dabei ging es vor allem um die Frage, ob die beobachtete Insensitivität der p38-MAP-Kinase gegenüber Messungen in MCF-7 Zellen zu bestätigen war. Analog zu den vorangestellten Untersuchungen wurden die MCF-7 Zellen mit 100nM BMP-2 für 4 und 8 Stunden inkubiert. Die serumfreie Kontrolle wurde auf die jeweiligen Zeitpunkte der Proben mit der Formel Q1 und Q2 verrechnet.

$Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$

$Q2 = Q1 / \text{serumfreie Kontrolle}$

β-Aktin wurde als Houskeeping-Protein zum Abgleich der Proteinmenge eingesetzt (Abbildungen 42 und 43). Anhand der grafischen Abbildung wird ersichtlich, dass die Applikation von Anisomycin zu allen Zeitpunkten einen deutlichen Effekt auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges ausübte. Die

Inkubationszeit von 30min zeigte mit einem 23,4fachen Wert gegenüber serumfreier Kontrolle den stärksten Anstieg. Somit konnten Literaturangaben bestätigt werden, dass Anisomycin die Induktion der Phosphorylierung von p38-MAP-Kinase bewirkt (Shafer und Slice 2005). Die erhobenen Daten sprechen abschließend für die Inaktivität des in der Durchflusszytometrie verwendeten fluoreszenzmarkierten pp38-MAP-Kinase-Antikörpers. Weitere intrazelluläre Effekte wurden durch die Stimulation der Zellen mit PMA ausgelöst. Die 30minütige Inkubation reichte zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges und zeigte zugleich den deutlichsten Effekt. BMP-2 konnte keinen Einfluss auf den Signalweg ausüben, was die Daten der FACS-Analyse bestätigt.

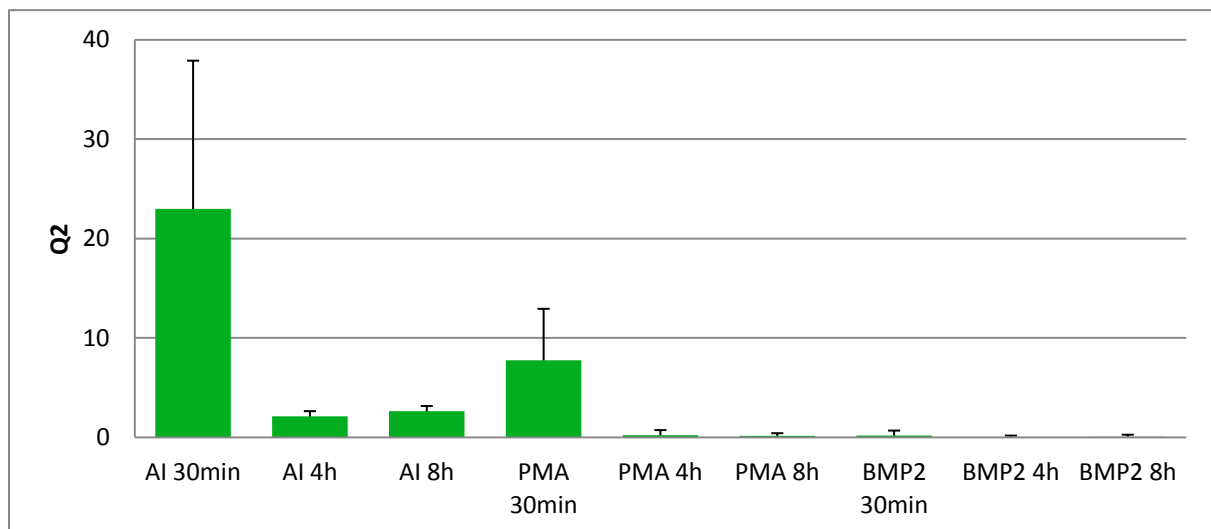


Abbildung 42: Western Blot-Analysen der Phosphorylierungssteigerung von p38-MAP-Kinase nach Inkubation mit Anisomycin (AI), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und BMP-2 im Zeitraum von 30min, 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrolle und β -Aktin.

Q1=phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; Q2=Q1/Kontrolle serumfrei; (n=3)

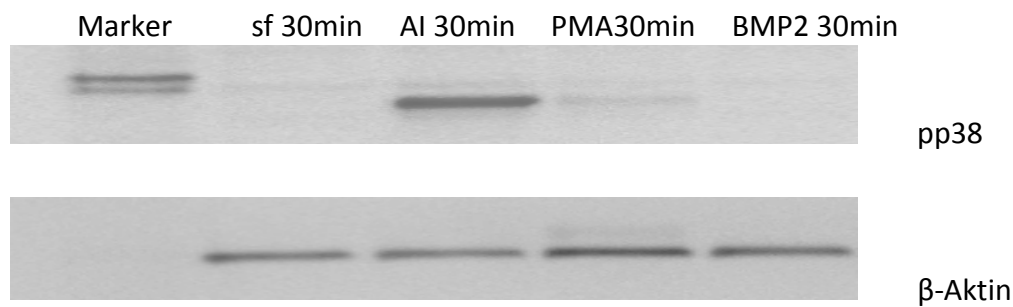


Abbildung 43: Western Blot-Banden nach 30 min Inkubation der Zellen mit dem pp38-MAP-Kinase-Antikörper und der Kontrolle β-Aktin.

Anschließend wurde die Wirkung der extrazellulären Inkubationsmedien auf den ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweg überprüft. Die Arbeitsschritte waren identisch und alle Experimente wurden dreifach wiederholt (Abbildung 44).

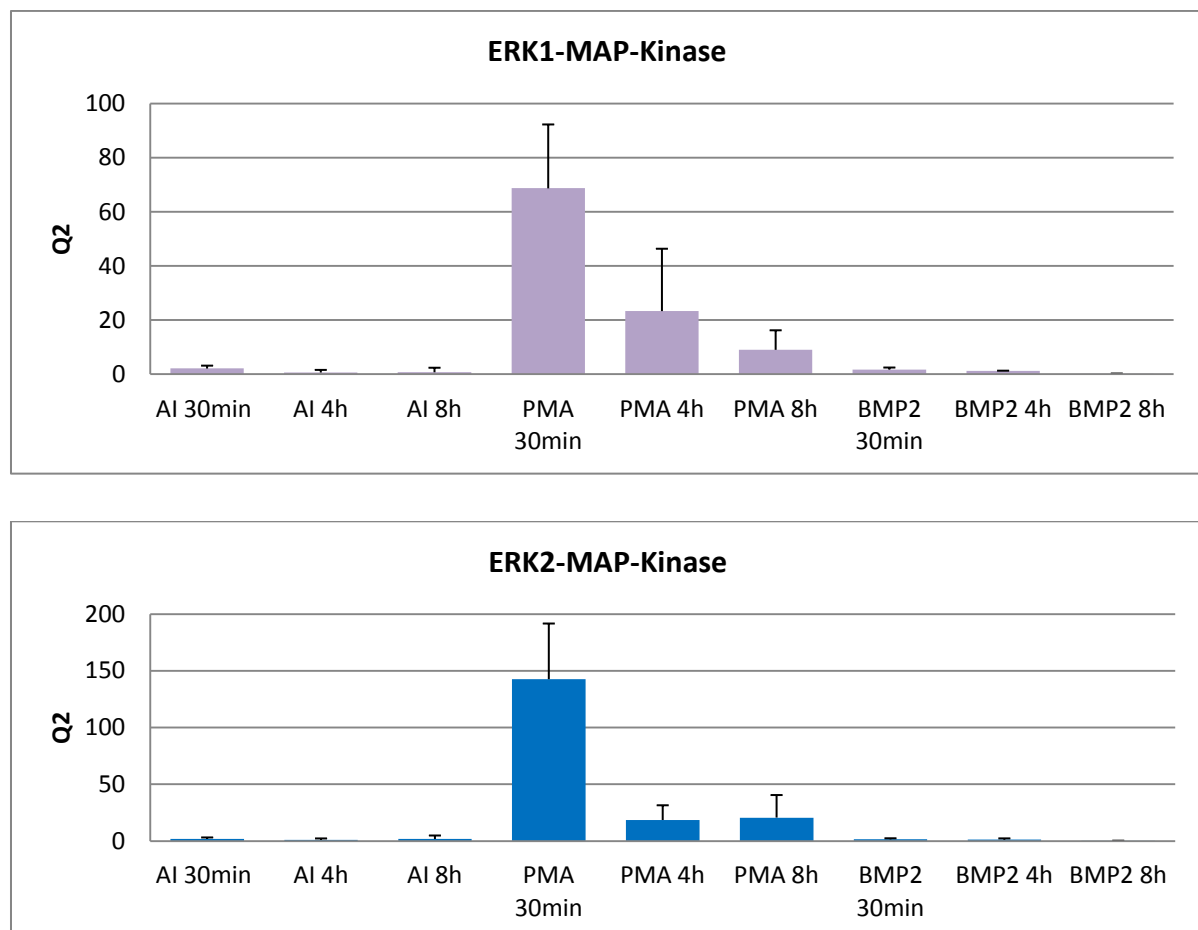


Abbildung 44: Western Blot-Analysen der Phosphorylierungssteigerung von ERK1/2-MAP-Kinase nach Inkubation mit Anisomycin (AI), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und BMP-2 im Zeitraum von 30min, 4h und 8h unter Berücksichtigung der serumfreien Kontrolle und β-Aktin. $Q1$ =phosphoryliertes Protein/nicht phosphoryliertes Protein; $Q2=Q1$ /Kontrolle serumfrei; (n=3)

Einzig die Inkubation mit PMA führte intrazellulär zur Induktion der Aktivierung des ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweges. Zu allen Zeitpunkten konnten Aktivierungen verzeichnet werden, wobei 30min Applikation mit PMA den höchsten Anstieg an phosphoryliertem ERK1/2-MAP-Kinase ergab (Abbildung 45). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen der quantitativen Durchflusszytometrie.

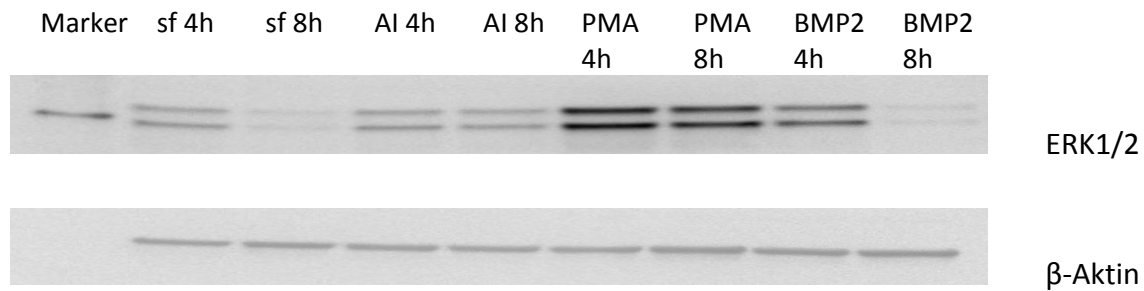


Abbildung 45: Western Blot- Banden der phosphorylierten, aktiven Form pERK1/2-MAP-Kinase und β-Aktin mit den unterschiedlichen Inkubationsmedien Anisomycin (AI), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), BMP-2 und der serumfreien Kontrolle (sf) im Zeitraum von 4h und 8h.

Der dritte und abschließend zu betrachtende Transduktionsweg weist vor allem Einflüsse nach Expression mit BMP-2 auf. Wie die Smad-Kaskade in den vorangegangenen Western Blot-Analysen zeigte sich zu allen Zeiten eine deutliche Phosphorylierungszunahme des Smad-Signalweges. Über die untersuchten Zeitpunkte verstärkte sich diese von 4,5fach nach 30min, 18,8 fach nach 4h und 25fach nach 8h Expression gegenüber der serumfreien Kontrolle, was mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie übereinstimmt. PMA und AI hingegen lösten keine Effekte auf dem Smad-Signalweg in den MCF-7 Zellen aus (Abbildung 46).

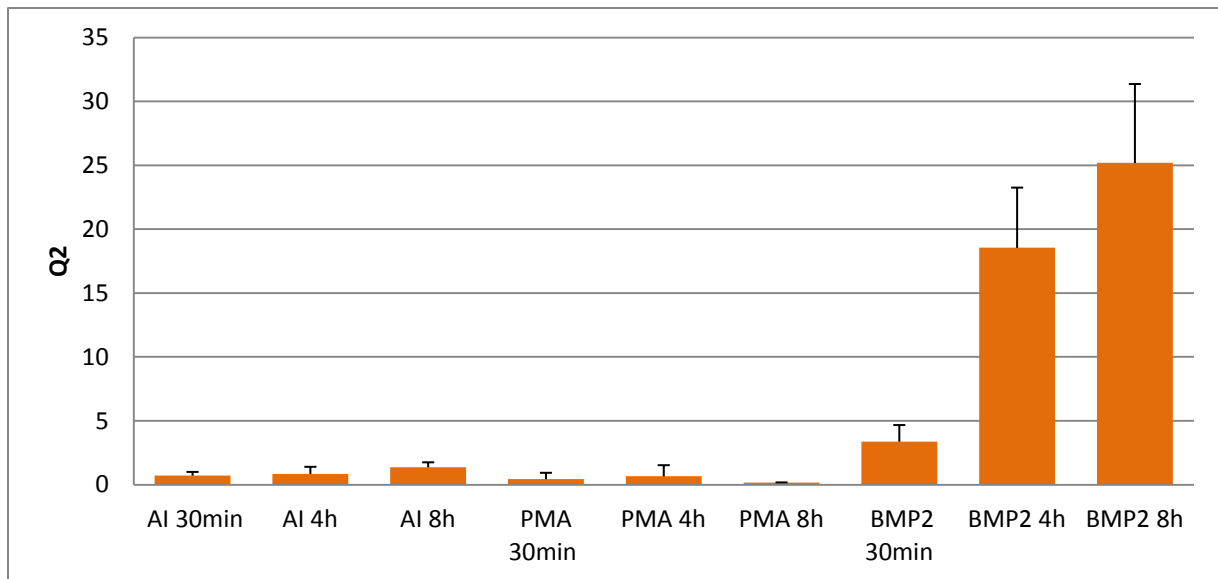


Abbildung 46: Western Blot-Analysen der Phosphorylierungssteigerung von Smad1/5/8 nach Inkubation mit Anisomycin (AI), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und BMP-2 im Zeitraum von 30min, 4h und 8h. $Q1 = \text{phosphoryliertes Protein} / \text{nicht phosphoryliertes Protein}$; $Q2 = Q1 / \text{Kontrolle serumfrei}$; (n=3)

Zusammengefasst konnten die Western Blot-Ergebnisse die in der Durchflusszytometrie erhobenen Daten reproduzieren und zu erwartende Ergebnisse weitgehend bestätigen. Warum es Abweichungen in der Phosphorylierungszunahme auf dem MAP-Kinase-Signalweg gab, bleibt ungeklärt, lässt aber Vermutungen zu.

6. Diskussion

Die Knochenmorphogenesefaktoren sind als Regulatoren in eine Vielzahl komplexer zellulärer Prozesse wie Proliferation, Chemotaxis, Differenzierung, Determination und Apoptose involviert (Yamashita und Miyazono 1999). Die Beteiligung an der Regulierung der Knochenbildung und des Knochenstoffwechsels gaben ihnen den Namen. Vermutungen, dass die BMPs eine bedeutende Rolle in der Onkogenese spielen, liegen nahe, da sich die Tumorzellen nach ihrer Entartung einer Entdifferenzierung unterwerfen, die embryonalen Signalmustern ähneln, in der die BMPs entscheidend wirken. Diese Schritte spielen sich auf molekularer Ebene ab, was in unserer Arbeitsgruppe Anlass zur Prüfung gab. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem tumorbiologischen Einfluss ausgewählter BMPs mit Hilfe der Aktivität endogener Signalproteine und der Änderung der Genexpression im Mammakarzinom, untersucht an der hormonsensitiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. Zur genaueren Vorstellung und Beurteilung des Wirkmechanismus wurde die BMP-Wirkung auf unterschiedlichen regulatorischen Niveaus moduliert, der Zeitraum der Inkubation umfasste 4h und 8h, Konzentrationsanalysen fanden mit 10ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml statt. Die Auswahl der BMPs bezog sich auf zwei gut untersuchte Untergruppen: BMP-2 ist ein Vertreter der Untergruppe BMP-2/-4. BMP-6 und BMP-7 gehören zur Untergruppe BMP-5/-6/-7. BMP-3 stellt eine weitere Gruppe der BMP-Familie dar und besitzt eine Sonderstellung, die sich in der antagonistischen Aktivität gegen osteoinduktive BMPs widerspiegelt (Bahamonde und Lyons 2001). Für die experimentelle Betrachtung schien es eine interessante und bedeutende Rolle zu spielen.

Mittels aufwendiger Experimente wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt: anhand der quantitativen RT-PCR wurde die Expression sowohl aktivierender als auch inhibierender Gene untersucht. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Expressionsveränderungen auf nukleärer Ebene zu beurteilen. Anhand von Fluoreszenzsignalen am Ende mehrerer Zyklen wird die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der RT-PCR vorgenommen. Durch geeignetes Design der genspezifischen Primer kann eine Amplifizierung des falschen Genproduktes nahezu ausgeschlossen werden. Die Herstellung mehrfacher Ansätze, unabhängige Wiederholungen und kritische Bewertung der

Experimente konnte Fehlerquellen minimieren. Weiterhin wurde durch die photometrische Bestimmung der Gesamt-RNA, der Einsatz von β -Aktin als Housekeeping-Gen zur Standardisierung sowie die Kontrolle der mRNA Menge und Berücksichtigung des Kontrollwertes aus der serumfreien Probe in der vorliegenden Arbeit eine Qualitätsverbesserung und Ergebniszuverlässigkeit gewährleistet. Die β -Aktin-mRNA liegt in allen Zellen annähernd in den gleichen Mengen vor, so dass das Expressionsniveau einen Rückschluss auf die eingesetzte Menge der Gesamt-RNA geben kann, wobei durch die verschiedenen Inkubationszeiten der Mammakarzinomzellen von 4h und 8h geringe Schwankungen nicht auszuschließen waren. Die Berechnung des Quotienten aus Proben mRNA/ β -Aktin-mRNA konnte die Auswertung der Daten qualitativ weiter verbessern. Zusätzlich wurden β -Aktin-Standards verwendet, worüber mittels Eichkurve das lineare Verhalten der Taq-Polymerase korrigiert werden konnte. Zu betonen ist, dass bei der Methode der RT-PCR bereits geringe Abweichungen der mRNA-Konzentration zu dramatischen Auswirkungen auf Menge und Aktivität des entsprechenden Proteins führen können.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden Signalproteine verschiedener endogener Signaltransduktionswege anhand ihres Phosphorylierungsgrades auf ihre Aktivität überprüft. Die Western Blot-Untersuchung stellt aufgrund der großen Anzahl von Arbeitsschritten eine eher fehleranfällige Untersuchungsmethode dar, erweist sich aber bei strenger Einhaltung des Protokolls als zuverlässig zur semiquantitativen Beurteilung von Proteinmengen. In vergleichbaren Untersuchungen wird die Proteinanalyse mittels Western Blot ebenfalls routinemäßig eingesetzt (Nohe et al. 2002), (Murakami et al. 2009). Von entscheidender Bedeutung ist die saubere Auftrennung des Proteingemisches während der Gelelektrophorese, da durch das Kochen der Probe in SDS-haltigen Puffern vor der Elektrophorese die Proteine unerwünscht fragmentieren können (Kowit und Maloney 1982). Auch können Proteinabbauprodukte zu Molekulargewichtsabweichungen im Gel führen. Das im Anschluss an die Gelelektrophorese stattfindende Blotten im Semi-Dry-Verfahren bietet neben einem geringeren Transferpufferverbrauch verkürzte Transferzeiten. Um eine zu starke Erwärmung des Blots und dadurch auftretende Luftblasen auf der Membran zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit längere Transferzeiten und niedrige Stromstärken gewählt. So konnten Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht besser sichtbar

gemacht werden. Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der Proteine anhand von Antikörpern, die gegen phosphorylierte und nicht phosphorylierte Aminosäuren der Zielproteine gerichtet sind, erweist sich als zuverlässig und valide, da die gleiche Membran mit beiden Antikörpern inkubiert werden konnte und abschließend immer eine Prüfung auf das Housekeeping-Protein β -Aktin erfolgte, wodurch eine Bestätigung vergleichbarer Proteinmengen möglich war. Diese Vorgehensweise garantiert die Aktivitätsmessung ein und desselben Proteins. Bei der Auswertung und Quantifizierung der Banden ergänzen sich digitale Aufnahmen und Röntgenfilm, wobei die hier verwendete CCD-Kamera mit über 3000 Graustufen klare Intensitätsvorteile aufweist.

Die Möglichkeit, Proteine in der intakten Zelle zu erfassen, macht die quantitative Durchflusszytometrie zu einem idealen Analyseverfahren. Diese Methode gewährleistet die Detektion intrazellulärer Proteine auf Einzelzelebene durch Fluoreszenzfarbstoff- markierte Antikörper und stellt eine die Zellphysiologie wenig beeinträchtigende Methode dar, die im Gegensatz zur enzymatischen Trypsinisierung ohne Funktionsveränderung und Zellmembranzerstörung einhergeht. Vorteil der angewandten Methode ist der alleinige Einsatz eines primären Antikörpers, der gegen einen Phosphatrest des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, so dass es zu geringeren unspezifischen Signalen kommt. Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen in einer sehr kurzen Zeit ($>1000/\text{sec}$) erhält man rasch repräsentative Informationen über Zell-Populationen auf sehr schnelle Weise. Das Waschen der mit Antikörper gefärbten Probe durch Zentrifugation reduziert Hintergrundsignale durch Entfernen der nicht gebundenen Antikörper. Beispielhaft sollte anhand des Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpers ERK1/2 die Aktivität des gleichnamigen Proteins nach BMP-2 Einfluss detektiert werden, um Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit der Methode bei ähnlichen Fragestellungen und die Validität der ermittelten Western Blot-Ergebnisse zu ziehen. Die eingeschränkte Verfügbarkeit spezifischer Antikörper hängt mit ihrer komplexen Herstellung zusammen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser und Fluorochrome (FITC und PE) konnte die Informationsdichte erhöht werden, so wurde ERK1/2-MAP-Kinase mit einem PE-Fluorochrom markierten Antikörper detektiert und im entsprechenden Kanal gemessen. Die p38-MAP-Kinase sollte sich mit dem FITC-Fluorochrom markierten Antikörper messen lassen, erwies sich aber leider als funktionsuntüchtig und dadurch nicht auswertbar. Das eindimensionale Histogramm stellt eine geeignete Methode

zur Datenauswertung dar, wobei darauf geachtet werden sollte, möglichst viele tausend Zellen zu messen, um ein gleichmäßiges Histogramm-Bild zu bekommen. Die Auswertung im Histogramm bietet die Möglichkeit, Überlagerungen von Fluoreszenzmarkierten Zellen und Kontrollproben darzustellen.

Grundsätzlich sind bei der Beurteilung der Western Blot-, Immunfluoreszenz- und RT-PCR Ergebnisse mögliche Fehlerquellen zu berücksichtigen. Angefangen bei der Zellkultivierung und Probenentnahme, über die einzelnen Experimentierschritte bis hin zur Auswertung der Daten können falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse und Artefakte das Versuchsergebnis beeinflussen. Um möglichst zuverlässige Enddaten zu erhalten, wurde in der Durchführung aller Experimente standardisiert vorgegangen und durch eine dreimalige Wiederholung mit identisch vorbehandelten Zellen gewährleistet. Ein individuell festgelegter Schwellenwert von 1,5, d.h. eine Expressionssteigerung von grösser 1,5fach gegenüber der serumfreien Kontrolle, wurde als eindeutig betrachtet, da die biologische Aktivität der Zelle immer abhängig ist von einem ausgeprägten Konzentrationsgradienten. Morphogene (endogene Signalproteine) spielen aufgrund dieses Gradienten besonders in der Embryogenese eine entscheidende Rolle, um die Differenzierung und Ausbildung der Organe zu steuern (Eldar et al. 2002, Dale und Wardle 1999).

Um ein komplexes Verständnis des Einflusses der BMPs auf die Tumorzellen zu erlangen, wurden mit Hilfe der RT-PCR gezielt Gene analysiert, die nach intensiver Literaturrecherche als tumorassoziiert und BMP-spezifisch gelten. ID-1 spielt eine wichtige Rolle in der Neovaskularisierung von Tumoren und wird besonders durch BMP-2 zeitabhängig hochreguliert (Clement et al. 2000). Durch die gewählten Inkubationszeiten von 4h und 8h konnte eine zeitabhängige signifikante ID-1-mRNA-Erhöhung nachgewiesen werden. Nahezu ausnahmslos mit allen verwendeten BMPs, außer BMP-3, zeigte sich der deutlichste Anstieg nach 4h. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigen eine maximale Induktionssteigerung der ID-1-mRNA in MCF-7 Zellen zwischen 4h und 24h nach BMP-2 Inkubation (Clement et al. 2000). In Myeloblasten der Maus zeigten Katarigi und Kollegen dagegen einen signifikanten Peak schon nach 1 Stunde (Katagiri et al. 1994). In embryonalen Stammzellen der Maus konnten Hollnagel und Kollegen eine BMP-2 bedingte Erhöhung der ID-1-mRNA mit maximaler Steigerung nach 1h bestätigen (Hollnagel et al. 1999). Das Antwortverhalten der verschiedenen Zelllinien gibt Hinweis auf ein unterschiedliches

Ansprechen der BMP-Signalwege und ein zeitlich differentes Ansprechen genetischer Programme. Zu vermuten ist weiterhin, dass omni- und pluripotente Zellen, im Gegensatz zu ausdifferenzierten Tumorzellen, sehr schnell und intensiv eine Induktion embryonal bedeutsamer Gene herbeiführen.

SKY als aktive Rezeptortyrosinkinase spielt eine bedeutende Rolle im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung. An physiologischem Brustdrüsengewebe der Maus wird so gut wie keine SKY-mRNA detektiert, wohingegen im Mammakarzinom bei Mäusen eine erhöhte SKY-mRNA-Transkription festgestellt wurde (Taylor et al. 1995). Dies lässt Vermutungen zu, dass eine BMP-2-bedingte Steigerung von SKY zur Malignitätszunahme und Progression von Brusttumoren beiträgt. Genauere Analysen zur Rolle der Rezeptortyrosinkinase in der Tumorgenese von Mammakarzinomen stehen allerdings noch aus. Mit dieser Arbeit konnte eine Expression der SKY-mRNA in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen werden. Nach zweizeitiger Inkubation mit allen gewählten BMPs, außer BMP-3, zeigte sich eine Transkriptionssteigerung der SKY-mRNA mit Abschwächung nach 8h, analog zum ID-1.

Weiterhin konnte anhand der experimentellen Daten gezeigt werden, dass BMP-2 und BMP-7 induzierte MCF-7 Zellen die Genexpression von Noggin zeitabhängig steigern (Abbildungen 7 und 18 im Ergebnisteil), was darauf hindeutet, dass Noggin über einen negativen Feedback-Mechanismus die BMP-Antwort der MCF-7 Zellen abschwächt. BMP-2 ist, wie oben beschrieben, an der Neovaskularisierung und Entstehung von Tumoren beteiligt, was durch den Antagonisten Noggin abgeschwächt wird (Langenfeld und Langenfeld 2004). Im Prostatakarzinom konnte der Nachweis erbracht werden, dass hohe Konzentrationen an BMP-6 und eine geringe Nogginexpression die Entstehung von Prostatakarzinommetastasen begünstigt (Yuen et al. 2008). Ein solcher Effekt konnte mithilfe der MCF-7 Zellen im Mammakarzinom molekularbiologisch nicht festgestellt werden.

Erwartungsgemäß zeigten sich BMP-spezifisch mRNA-Transkriptionssteigerungen der BMP-Liganden -2,-3,-6 und -7. Während durch BMP-3 einzig das BMP-2 und -7 Transkript vermehrt auftrat, konnten BMP-2, BMP-6 und -7 eine Transkriptionssteigerung aller anderen untersuchten Gene herbeiführen. Die BMP-2 mRNA wurde im Vergleich zu den anderen Genexpressionen unabhängig von der BMP-Vorbehandlung übermäßig stark exprimiert. Dies könnte durch ein niedriges basales Expressionsniveau von BMP-2 in MCF-7 Zellen begründet sein. Denkbar wäre auch, dass die Homöostase der Zellen BMP-2 abhängig ist.

Nach Inkubation mit BMP-3 konnte, abgesehen von der BMP-7 mRNA nach 8h, keine mRNA der untersuchten Gene detektiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass vermutlich keine Transkription stattfand oder das Expressionslevel sehr gering ausfiel. BMP-3 scheint keinen Einfluss auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zu haben, was die Sonderrolle dieses Proteins unterstreicht.

Generell deutet die Expressionsuntersuchung auf eine immer wiederkehrende Tendenz. Alle betrachteten Gene, mit Ausnahme von Noggin und BMP-7, zeigen unabhängig vom BMP eine Transkriptionsabschwächung nach 8h, womit bestätigt wird, dass eine intrazelluläre Aktivierung immer zeitlich begrenzt erfolgt. Die zelluläre Antwort wird somit zeitabhängig gepuffert, um den Grundzustand, also die Bereitschaft, auf ein neues Signal zu reagieren, wiederherzustellen.

Neben den Effekten auf Transkriptionsebene stand die Betrachtung der Modulation endogener Signalproteine nach BMP-Inkubation im Mittelpunkt der Untersuchung. Es wurde der BMP-induzierte Phosphorylierungsgrad verschiedener intrazellulärer Signalproteine (Smad1/5/8, AKT-Kinase, p38-MAP-Kinase, ERK1/2-MAP-Kinase) untersucht, da viele Bindungspartner und Zielmoleküle essentieller Bestandteil verschiedener Signalwege sind und während der embryonalen Entwicklung und Ausreifung des Organismus wichtige Interaktionen zwischen BMP/TGF- β , MAP-Kinase, PI3K/AKT und anderen endogenen Signalwegen bestehen, die zeitlich eng aufeinander abgestimmt sind und eine unerlässliche Rolle in der Regulierung biologischer Prozesse wie Zellüberleben und Apoptose spielen, Alterationen auch Tumorentstehung oder -proliferation begünstigen. So bildet aktiviertes AKT in Epithelzellen einen Komplex mit unphosphoryliertem Smad3, der über die Zellmembran abgesondert wird und Apoptose verhindert (Conery et al. 2004).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass BMP-2 die Dedifferenzierung von Tumorzellen und gleichzeitig die Migrations- und Invasionsneigung erhöht (Clement et al. 2005). In der Literatur wird BMP-2 als Wachstumsfaktor mit unterschiedlichen Aktivitäten beschrieben: Einerseits wird eine wachstumshemmende Wirkung durch BMP-2 beschrieben (Gautschi et al. 2008), wobei es die estradiolinduzierte Proliferation von Mammakarzinomzellen inhibiert (Ghosh-Choudhury et al. 2000). Andererseits weisen Daten auf eine gesteigerte Proliferation der Tumoren durch BMP-2 hin (Langenfeld et al. 2006).

BMP-2 induziert hierbei die Tumorangiogenese in vitro beim Mammakarzinom (Clement et al. 2005). Eine mögliche Erklärung dieser Divergenz könnte die Expositionsdauer der BMPs auf die Zellen sein. Shimasaki und Kollegen berichten von zeitabhängigen Expressionsmustern rekombinanter BMPs in reproduktiven Geweben (Shimasaki et al. 2004). Anhand ektodermaler Linsenplakoden konnten Sjödal und Kollegen eine Schlüsselrolle der Expositionsdauer auf Übertragung von BMP-Signalen zur Spezifizierung der Zellen bestätigen (Sjodal et al. 2007). Die vorliegenden Daten zeigten einen Anstieg an phosphoryliertem Smad1/5/8 über den Zeitraum von 30min bis 8h (Abbildung 46). Der zunehmende Phosphorylierungsgrad lässt vermuten, dass in Abhängigkeit von der Zeit die Bindungsaffinität des Liganden am Rezeptor variiert und/ oder ein ausgeprägter Konzentrationsgradient in Zusammenhang mit der Expositionsdauer verantwortlich ist. Die biologische Aktivität ist abhängig von einem Schwellenwert (Wilson et al. 1997), (Green et al. 1992), (Gurdon et al. 1994), (Gurdon et al. 1995). Die Annahme, dass BMPs konzentrations- und zeitabhängig über eine Veränderung der Signalweiterleitung unterschiedlich zellproliferativ wirken und Zellmodulationen hervorrufen, konnten in diversen Arbeiten belegt werden (Steinert et al. 2008), (Ye et al. 2008), (Clement et al. 2000). Die in dieser Arbeit experimentell einheitlich verwendete Konzentration von 100nM für alle BMPs wurde für BMP-2 und BMP-6 exemplarisch auf 10nM variiert. Die Ergebnisse zeigten mit einem Zehntel der Standardkonzentration eine geringere Phosphorylierungsneigung des Smad-Signalweges (Abbildung 27 und 29). Die Konzentration von BMP-6 wurde außerdem auf 200nM angehoben, was zu einer starken Regression der Phosphorylierung führte (Abbildung 30). Untersuchungen an Xenopus-Embryonen zeigten, dass eine BMP-Konzentration von 5nM nach 30min Exposition zu einer schwachen Smad1-Phosphorylierung führte, während 500nM BMP schon nach 5min eine deutliche Aktivität des Smad1-Proteins auslösten (Simeoni und Gurdon 2007). Dies lässt vermuten, dass eine BMP-Konzentration von 200nM in MCF-7 Zellen zu einer sehr schnellen temporären Signalweiterleitung führt, die unter 4h liegt und schwächer wird, je länger die Inkubationszeit andauert.

Die eingesetzten 100nM BMP erwiesen sich als besonders aussagekräftig bezüglich endogener Veränderungen, was andere Arbeiten bestätigen (Upton et al. 2008). Neben einer Zelltypspezifität könnten diverse spezifische Zytokine in der Tumorumgebung und die

Verteilung der Inhibitoren bzw. Modulatoren eine entscheidende Rolle in der Tumorbilogie spielen (Tribulo et al. 2003).

Vom Proteinaufbau her verbindet der für die Interaktion des BMP-2 mit dem Typ-I-Rezeptor typische und wichtige Prehelix-Loop bei BMP-6 zwei verschiedene Regionen, die für die Flexibilität des Loop-Segments in der ungebundenen Region wichtig sind. Dieses Segment ist essentiell für die Bindung des BMP-6 am Typ-I-Rezeptor (Saremba et al. 2008). Dies spricht für eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von BMP-6, es löst eine im Vergleich zu den Ergebnissen des BMP-2 stärkere Induktion des Smad-Signalweges aus. In der Literatur wird dieser Effekt anhand ausgewählter endokriner Gewebe bestätigt (Takahashi et al. 2008). Gewebe wie Granulosatumorzellen des Ovar zeigen eine Stimulation des Smad1/5/8 durch BMP-6 (Kaivo-oja et al. 2006). Anhand der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wurden BMP-6 abhängig antiapoptotische Effekte via Aktivierung des Smad-Signalweges und des MAP-Kinase-Signalweges nachgewiesen (Du et al. 2008).

Das homodimere Protein BMP-7 löst über eine verstärkte Rezeptorbindung eine Smad-vermittelte BMP-Signalkaskade aus. In den MCF-7 Zellen kommt es zeitunabhängig zu einer Phosphorylierungssteigerung von Smad1/5/8 (Abbildung 19). Es kann davon ausgegangen werden, dass vorwiegend über diesen Phosphorylierungsweg unterschiedliche genetische Programme angesprochen werden, die eine Tumorphiliferation auslösen. In embryonalen P19-Karzinomzellen konnte gezeigt werden, dass BMP-7 über die Bindung an ActRII und anschließender Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes mit ALK-2 eine Phosphorylierung von Smad1 bewirkt (Macias-Silva et al. 1998). In der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 antagonisierte BMP-7 das Smad-abhängige TGF- β -Signal, wodurch eine inverse Beziehung zu Tumorstachstum und Invasivität besteht, d.h. eine Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms vermindert wird. Buijs und Kollegen konnten zeigen, dass eine Progression der Knochenmetastasierung durch Überexpression von BMP-7 in vitro unterdrückt wird (Buijs et al. 2007).

BMP-3 als Disulfid-gebundenes Homodimer konnte in vitro keine Smad-vermittelte Zellaktivierung auslösen, während seine Mutanten eine Phosphorylierung von Smad1/5/8 bewirkten, wobei BMP-3 Sm04 die deutlichsten Ergebnisse liefert. Dies zeigt, dass die Veränderung von wenigen Aminosäuren in der putativen Bindungsregion einen anderen

Bindungsmodus am extrazellulären Rezeptor bewirkt bzw. daraus endogen eine verstärkte Aktivierung resultiert. Im *Xenopus* löst eine Bindung von BMP-3 an ActRIIB keine Aktivierung von R-Smad aus, weitere Transduktionssignale werden dadurch unterdrückt (Gamer et al. 2005). BMP-3 ist auch nicht in der Lage, den BMP-Typ-I-Rezeptor zu aktivieren (Daluiski et al. 2001).

Mit Hilfe von ALK-3 (eD ALK-3), einer rekombinant hergestellten extrazellulären Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors und spezifischem Inhibitor der BMPs, wurde parallel zu den Inkubationsversuchen mit BMP-2 auf Rezeptorebene untersucht, ob sich der inhibierende Effekt auf BMP-2 bestätigt. Im weiteren Interesse stand die zeit- und konzentrationsabhängige Analyse der BMP-2-/Rezeptor-Interaktion. Es gibt Vermutungen, dass eD ALK-3 an die Extrazellulärmatrix bindet und so BMPs freisetzt, die über Rezeptoren eine endogene Signalkaskade auslösen (P.Hortsschansky, HKI, persönliche Mitteilung). Mit diesem Hintergrund wurden die MCF-7 Zellen mit eD ALK-3 und BMP-2 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 inkubiert und analysiert. In vitro kam es zu einer vielfach höheren intrazellulären Smad-Phosphorylierung gegenüber der alleinigen Induktion mit eD ALK-3, die kein signifikantes Ergebnis erbrachte (Abbildungen 25 und 26). Weiterhin war auffällig, dass die Phosphorylierung im Vergleich zu den reinen BMP-2 Inkubationsversuchen, unabhängig von der Konzentration und der Zeit, sehr viel stärker ausfiel. Die mehrfache Wiederholung der Experimente mit dem Inhibitor eD ALK-3 und BMP-2 bestätigte eine deutliche Induktion der Smad-Signalproteine. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass eD ALK-3 in Abhängigkeit von der externen Zugabe von BMP-2 verstärkt schon vorhandenes BMP-2 aus der Extrazellulärmatrix mobilisiert und durch diese Flut von BMP-2 eine große Bereitschaft der Tumorzellen besteht, intrazellulär Signale weiterzuleiten. Extrazellulär kommt es zu einer Komplexbildung zwischen BMP-2 und dem Rezeptor, wodurch der hemmende Effekt von ALK-3 ausbleibt, den eD ALK-3 alleine auslöst. Anhand von Myelomzellen wurde beschrieben, dass ALK-3 als Typ-I-Rezeptor ohne Anwesenheit eines Typ-II-Rezeptors eine schwache BMP-2 Bindung bewirkt. Durch Affinitätssteigerung zum Typ-II-Rezeptor kommt es zur Induktion eines BMP-Rezeptorkomplexes, wobei die aktive Domäne des Typ-II-Rezeptors den Typ-I-Rezeptor phosphoryliert und dadurch intrazellulär die Smad-Kaskade aktiviert wird (Upton et al. 2008). Arbeiten, in denen Konzentrationsunterschiede zum Einsatz kamen, d.h. ein stöchiometrisches Verhältnis von 2:1 für die extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-IA-Rezeptor und BMP-2 angewandt wurde, konnten eine deutliche Hemmung nachweisen

(Lichtenberg et al. 2004). Auch wäre eine Erhöhung des mRNA-Transkriptes von ALK-3 (was nicht geprüft wurde) mit nachfolgender Rezeptorverdichtung auf der Zelloberfläche und erhöhter BMP-2-Ligandenbindung möglich, die schließlich eine verstärkte Smad1/5/8-Phosphorylierung auslöste (Rosendahl et al. 2002), (Upton et al. 2008). Die Beteiligung akzessorischer Proteine zur selektiven BMP-Ligandenbindung ist weiterhin zu prüfen.

Noggin bindet und inaktiviert Mitglieder der TGF- β Familie wie BMP-2,-4,-5,-6, und -7. Es bindet spezifisch mit unterschiedlich hoher Bindungsaffinität an den hydrophoben Teil des BMPs und inhibiert so die Interaktion zwischen BMP und Typ-I- und Typ-II-Rezeptor durch eine Blockierung der Bindungsepitope, so dass weitere Rezeptor-Interaktionen unterbunden werden und es intrazellulär zu einer Hemmung der Signale kommt (Zimmerman et al. 1996), (Groppe et al. 2002). Die hier erhobenen Daten bestätigen, dass eine intrazelluläre Aktivierung von Smad1/5/8 nach Behandlung der Zellen mit Noggin ausbleibt, Noggin als Antagonist das BMP-Signal blockiert.

MAP-Kinasen sind neben den Smad-Proteinen essentieller Bestandteil in der BMP-Signalkaskade. Die Knochenmorphogenesefaktoren modulieren mithilfe dieser Kinasen Smad-abhängig und -unabhängig die Tumorzellaktivität. MAP-Kinasen, wie p38 und ERK1/2, sichern Funktionen der Proliferation, Migration und Zellüberleben. Stressinduziert kommt es durch Aktivierung des Smad- und p38-MAP-Kinase-Signalweges u.a. zu antiapoptotischen Effekten (Du et al. 2008). Diverse Studien zeigen, dass rezeptorwirksame Proteine wie HER2 und ErbB2 mit Hilfe endogener Smad-Proteine sowohl über den MAP-Kinase- als auch den AKT-Signalweg kommunizieren, um die Karzinomentwicklung der Brust zu begünstigen (Ueda et al. 2004), (Wang et al. 2008), (Seton-Rogers und Brugge 2004). Aufgrund dieser Tatsache stellt sich die Frage, ob und inwiefern die rezeptorwirksamen BMPs eine onkogene Wirkung im Mammakarzinom über die MAP-Kinase-Signalwege aufweisen. Auch die Tatsache, dass „crosstalks“ zwischen den einzelnen Signalwegen bekannt sind, also Verbindungen einzelner Signalwege über Schlüsselproteine wie Smad1 oder Smad4, lässt eine experimentelle Prüfung interessant erscheinen. TGF- β - und MAP-Kinase-Signalwege kooperieren häufig, treten aber auch in Konkurrenz (Verrecchia et al. 2003). Die flexible Linkerregion des Smad1, reich an Serin-, Threonin- und Prolin-Resten, ermöglicht eine Interaktion mit verschiedenen Kinasen. Die aktivierte ERK-MAP-Kinase kann aufgrund passender Phosphorylierungsstellen Smad1 aktivieren und über den Smad1/4-Komplex eine

nukleäre Modulation hervorrufen (Mulder 2000). Anhand der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF10CA1h konnten Kamaraju und Kollegen nachweisen, dass über die aktivierte p38-MAP-Kinase der Ser203 und Ser207 Rest in der Smad2/3 Linkerregion phosphoryliert wird, Smad2/3 dadurch sein volles Transaktivierungspotential erreicht und der Komplex zur TGF- β induzierten Wachstumsverzögerung führt (Kamaraju und Roberts 2005).

Hanafusa und Kollegen beschrieben 1999 erstmals einen Zusammenhang zwischen TGF- β und der Aktivierung von p38-MAP-Kinase (Hanafusa et al. 1999). In Zellen aus Brustdrüsengewebe trägt p38-MAP-Kinase zur epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung und zur verstärkten Migration nach TGF- β Stimulation bei (Bakin et al. 2002). Daneben steht p38-MAP-Kinase im Verdacht, die Tumorphosphorylierung in östrogensensitiven Brustkrebszellen zu beschleunigen (Takahashi et al. 2008). Die BMP-2 abhängige Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges im invasiven Mammakarzinom schützt maligne Zellen durch auto- und parakrine Mechanismen vor dem hypoxischen Zelltod (Raida et al. 2005). Nakamura und Kollegen beschreiben anhand der chondrogenen Zelllinie ATDC5 eine Induktion der p38-MAP-Kinase durch BMP-2 (Nakamura et al. 1999). Eine BMP-2 induzierte Aktivierung der p38-MAP-Kinase im Sinne einer signifikanten Phosphorylierungssteigerung konnte nach Untersuchung der MCF-7 Zellen in der hier vorliegenden Arbeit nicht konstatiert werden, auch Analysen mit BMP-6 und BMP-7 verliefen diesbezüglich negativ. Dieser Widerspruch lässt sich im Ansatz dadurch erklären, dass aufgrund der unterschiedlichen Zellart eine tumorassoziierte extra- und intrazelluläre Modulation die Phosphorylierungssensibilität erhöht oder eine Veränderung des MAP-Kinase-Weges durch BMP-aktivierte Smads vorliegt (Gazzerro und Canalis 2006). Da absolute Voraussetzung zur Stimulation der Tumorzellen die Formierung heteromerer Komplexe des BMPRI und BRII ist (Nohe et al. 2002), könnte es aufgrund der gewählten Zeitpunkte zur unvollständigen Formierung und zum Ausbleiben der Weiterleitung des BMP-Signals gekommen sein. Dies könnte auch eine naheliegende Bestätigung durch die deutliche Aktivitätserhöhung nach 30minütiger Inkubationszeit mit PMA, einem bekannten Aktivator der MAP-Kinase-Signalwege ERK1/2, JNK und p38, erfahren, da die 4h und 8h Untersuchung ohne positives Ergebnis blieb. Eine Aktivierung zu allen festgelegten Zeitpunkten zeigte die p38-MAP-Kinase dagegen nach Behandlung mit Anisomycin, einem potenten Aktivator stressinduzierter Proteinkinasen wie p38 (Rabenoelina et al. 2002). In Abhängigkeit von der Zeit verringerte sich die Phosphorylierungsneigung deutlich.

Des Weiteren stand der ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweg im Interesse unserer Betrachtungen, da Literaturangaben Hinweise geben, dass besonders BMP-2 über eine ERK1/2-MAP-Kinase Phosphorylierung das Tumorstadium steigern (Langenfeld und Langenfeld 2004). Veränderungen des MAP-Kinase-Signalweges spielen in ca. 30% aller Krebsarten eine Rolle. In Mauskeratinozyten beispielsweise kommt es nach TGF- β -Stimulation zur Erhöhung des basalen Phospho-ERK-Anteils mit entsprechender Dedifferenzierung und erhöhter Migrationsrate (Iglesias et al. 2000). In der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 dagegen kommt es nach Hemmung der MAP-Kinase zur Abnahme von TGF- β 1 induzierter Migration (Dumont et al. 2003). Interessant erschien auch die modulierende Wirkung BMP-aktivierender Smads. Während BMP durch eine carboxy-terminale Phosphorylierung des Serinrestes Smad1 aktiviert und dies zu einer Steigerung der Induktion führt, phosphoryliert ERK einen Serinrest in der Linkerregion mit dem Ziel einer Blockade der transkriptionellen Aktivität von Smad1 (Gazzerro und Canalis 2006). Analog zu Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ERK1/2-MAP-Kinase in den Western Blot-Untersuchungen durch keines der untersuchten extrazellulären Proteine stimuliert werden, die MCF-7 Zellen zeigten sich einzig durch BMP-7 nach längerer Stimulation responsiv. Experimente an Typ-10 Kollagen unterstreichen die hemmende Rolle des ERK1/2 in der Transkription von BMP-2 (Reilly et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinase nach Inkubation mit BMP-2 mithilfe der durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen (Abbildungen 39 und 40). Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten darin begründet liegen, dass die FACS-Analyse zeitlich genauer dem physiologischen Zellzyklus angelehnt ist. Möglich wäre auch eine höhere Sensitivität des Verfahrens, da viele Western Blot-Zwischenschritte mit einem erhöhten Proteinverlust einhergehen. Literaturangaben geben wiederum Hinweise, dass eine erhebliche temporäre Abhängigkeit besteht (Frey und Mulder 1997). Um die Validität genauer zu prüfen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) als Promotor der Tumorentstehung und Kontrollmedium bestätigt anhand der erwarteten signifikanten Aktivität der ERK1/2- und p38-MAP-Kinase eine korrekte Durchführung der Experimente. Zudem beweist PMA eine strenge Regulation des MAP-Kinase-Signalweges, während es keinen Einfluss auf den Smad-Signalweg nimmt.

Die Serin-Threonin Proteinkinase, auch Proteinkinase B genannt, ist initial ein downstream-Effektor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Exogene Stimulatoren wie

Wachstumsfaktoren und Zytokine phosphorylieren PIP2 und generieren Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat, was inaktives AKT über mehrere Zwischenschritte in aktiviertes AKT umwandelt. AKT ist u.a. an der Signalvermittlung für Zellwachstum, Differenzierung und Zellzyklusprogression beteiligt. Die AKT-Aktivierung ist zelltypabhängig und indirekt, oft in Verbindung mit MAP-Kinasen oder autokriner Aktivierung bestimmter Moleküle. BMPs phosphorylieren AKT, um die Osteoblastendifferenzierung zu verstärken. Die Aktivität von PI3K ist mit der Lipidphosphatase PTEN assoziiert, die Phosphatgruppe am Inositolring von PIP3 wird abgelöst und die AKT-Aktivierung blockiert. Loss-of-Function Mutationen des PTEN ereignen sich häufig in Krebszellen, so dass AKT vermehrt vorkommt. Die sehr starke Aktivierung der PI3K/AKT führt dazu, dass nicht nur Apoptose, sondern auch TGF- β induzierte Zytostase verhindert wird, was die Tumorphiliferation begünstigt (Atfi et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der MCF-7 Zelllinie eine deutliche Aktivierung der AKT-Kinase nach Behandlung mit BMP-6 gezeigt werden (Abbildung 17), wodurch es auf nukleärer Ebene neben der Autoregulation von BMP-6 zu einem temporären Anstieg der mRNA von ID-1, SKY, BMP-2 und BMP-3 kam (Abbildung 15), was wiederum über eine BMP-6 Expressionssteigerung zur Proliferation der Tumorzellen führte. Es liegt nahe, dass BMP-6 die Motilität und Invasion der Mammakarzinomzellen durch Aktivierung der PI3 Kinase/AKT fördert. Die therapeutische Option könnte darin bestehen, durch Beeinflussung dieses Signalweges der Metastasierung und Progression von Brustkrebs entgegenzuwirken. Eine äquimolare Behandlung der Zellen mit eD ALK-3 und BMP-2 erbrachte eine temporäre AKT-Aktivierung, was verdeutlicht, dass ALK-3 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bedeutend ist für die BMP-2 Induktion und über den PI3K/AKT-Signalweg Proliferation und Genexpression reguliert werden. Interessant wäre zu prüfen, ob ALK-3 auch für andere BMPs als Rezeptor dient, da bekannt ist, dass ALK-3 in Makrophagen einen funktionellen BMP-6 Rezeptor darstellt (Hong et al. 2009). Experimente mit BMP-2-induzierten MCF-7 Zellen ergaben keine Phosphorylierungssteigerung der AKT-Kinase, wohingegen Ghosh-Choudhury und Kollegen anhand von Osteoblasten belegen, dass BMP-2 die Induktion der Phosphorylierung der AKT-Untereinheit Serin473 auslöst und folglich die Transkription stimuliert, um die BMP-2 Expression zu steigern (Ghosh-Choudhury et al. 2002). Weitere Daten von Tumorzellanalysen bestätigen eine Phosphorylierungssteigerung von AKT nach Behandlung mit BMP-2 (Kang et al.). Die Begründung der ausbleibenden Phosphorylierungssteigerung in der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass MCF-7 sensitiv für

Smad-abhängige Signalwege, aber nur wenig sensitiv für Smad-unabhängige Signalwege ist, wenn eine BMP-2 Induktion stattfindet. Im Gegensatz zu den Voruntersuchungen endogener Smad-Signalproteine konnte eD ALK-3 ohne die gleichzeitige Inkubation mit BMP-2 eine konzentrationsabhängige, aber zeitunabhängige Aktivitätssteigerung der PI3K/AKT auslösen. Über den Wirkmechanismus kann nur spekuliert werden. Einerseits ist vorstellbar, dass 100nM der extrazellulären Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors so viel aktivierendes BMP aus der Extrazellulärmatrix freisetzt, dass eine Signalübertragung ins Zellinnere stattfinden kann und AKT, als auch BMP-6, phosphoryliert wird. Andererseits könnte es durch die alleinige Induktion mit eD ALK-3 zu einer Überexpression der AKT-Rezeptor-Kinase gekommen sein, die unabhängig vom Liganden verschiedene Signalsysteme aktiviert. Denkbar ist auch eine kinaseunabhängige Aktivierung von AKT, was zur Modulation TGF- β induzierter Transkription führte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl aktivierende als auch inhibierende BMPs molekularbiologisch eine entscheidende Rolle in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms spielen. Diese Daten tragen zum Verständnis der Signalübertragung der BMPs in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 bei und unterstützen Aussagen, dass BMPs in einem fortgeschrittenen Stadium die Tumorprogression begünstigen. Hinweise auf die Variabilität und Komplexität der zellmodulierenden Wirkung einzelner BMPs werden den hier erhobenen Daten bekräftigt. Ein interessanter Aspekt ist die BMP-bedingte konzentrations- und zeitabhängige MCF-7 Zellmodulation, die durch vielfältige Ansatzpunkte experimentell beleuchtet wurde und Raum für ergänzende Untersuchungen bietet, um ein besseres Verständnis der komplexen BMP-Wirkung zu erlangen.

III. Literaturverzeichnis

- Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M, Miyazono K. 2001. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci*, 114 (Pt 8):1483-1489.
- Arnold SF, Tims E, McGrath BE. 1999. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine*, 11 (12):1031-1037.
- Atfi A, Abecassis L, Bourgeade MF. 2005. Bcr-Abl activates the AKT/Fox O3 signalling pathway to restrict transforming growth factor-beta-mediated cytostatic signals. *EMBO Rep*, 6 (10):985-991.
- Bachiller D, Klingensmith J, Shneyder N, Tran U, Anderson R, Rossant J, De Robertis EM. 2003. The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome. *Development*, 130 (15):3567-3578.
- Bahamonde ME, Lyons KM. 2001. BMP3: to be or not to be a BMP. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1 (Pt 1):S56-62.
- Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci*, 115 (Pt 15):3193-3206.
- Beck SE, Jung BH, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, Huang SC, Chow JY, Carethers JM. 2006. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291 (1):G135-145.
- Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. 1996. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development*, 122 (6):1693-1702.
- Bentley H, Hamdy FC, Hart KA, Seid JM, Williams JL, Johnstone D, Russell RG. 1992. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*, 66 (6):1159-1163.
- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. 1999. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 189 (7):1139-1148.
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD. 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*, 248 (17):6251-6253.
- Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I, Schwaninger R, Rentsch C, Ten Dijke P, Cleton-Jansen AM, Driouch K, Lidereau R, Bachelier R, Vukicevic S, Clezardin P, Papapoulos SE, Cecchini MG, Lowik CW, van der Pluijm G. 2007. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res*, 67 (18):8742-8751.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22 (4):233-241.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. 2001. MAP kinases. *Chem Rev*, 101 (8):2449-2476.
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85-A (8):1544-1552.
- Clement JH, Sanger J, Hoffken K. 1999. Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor. *Int J Cancer*, 80 (2):250-256.
- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (5):271-279.

- Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Hoffken K, Wolft S, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol*, 27 (2):401-407.
- Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K. 2004. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol*, 6 (4):366-372.
- Dai Z, Popkie AP, Zhu WG, Timmers CD, Raval A, Tannehill-Gregg S, Morrison CD, Auer H, Kratzke RA, Niehans G, Amatschek S, Sommergruber W, Leone GW, Rosol T, Otterson GA, Plass C. 2004. Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 23 (20):3521-3529.
- Dale L, Wardle FC. 1999. A gradient of BMP activity specifies dorsal-ventral fates in early *Xenopus* embryos. *Semin Cell Dev Biol*, 10 (3):319-326.
- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. 2001. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*, 27 (1):84-88.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, 257 (5068):369-373.
- den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. 2003. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*, 21 (3):521-528.
- Du J, Yang S, Wang Z, Zhai C, Yuan W, Lei R, Zhang J, Zhu T. 2008. Bone morphogenetic protein 6 inhibit stress-induced breast cancer cells apoptosis via both Smad and p38 pathways. *J Cell Biochem*, 103 (5):1584-1597.
- Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. 2003. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem*, 278 (5):3275-3285.
- Eldar A, Dorfman R, Weiss D, Ashe H, Shilo BZ, Barkai N. 2002. Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. *Nature*, 419 (6904):304-308.
- Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M. 1997. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev*, 63 (1):39-50.
- Ferguson EL. 1996. Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. *Curr Opin Genet Dev*, 6 (4):424-431.
- Fortino V, Torricelli C, Capurro E, Sacchi G, Valacchi G, Maioli E. 2008. Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest*, 26 (1):13-21.
- Frey RS, Mulder KM. 1997. TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 117 (1):41-50.
- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. 2006. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem*, 98 (3):538-554.
- Gamer LW, Nove J, Levin M, Rosen V. 2005. BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 285 (1):156-168.
- Gautschi O, Tepper CG, Purnell PR, Izumiya Y, Evans CP, Green TP, Desprez PY, Lara PN, Gandara DR, Mack PC, Kung HJ. 2008. Regulation of Id1 expression by SRC: implications for targeting of the bone morphogenetic protein pathway in cancer. *Cancer Res*, 68 (7):2250-2258.
- Gazzerro E, Canalis E. 2006. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord*, 7 (1-2):51-65.
- Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Chandrasekar B, Ghosh Choudhury G. 2003. BMP-2 regulates cardiomyocyte contractility in a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent manner. *FEBS Lett*, 544 (1-3):181-184.
- Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG. 2002. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem*, 277 (36):33361-33368.

- Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A, Ghosh PM, Moyer M, Abboud SL, Kreisberg J. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1497 (2):186-196.
- Giannoudis PV, Tzioupis C. 2005. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury*, 36 Suppl 3:S47-50.
- Glister C, Kemp CF, Knight PG. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, 127 (2):239-254.
- Graham H, Peng C. 2006. Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6 (1):45-58.
- Green JB, New HV, Smith JC. 1992. Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell*, 71 (5):731-739.
- Griffith DL, Oppermann H, Rueger DC, Sampath TK, Tucker RF, Carlson WD. 1994. Crystallization and preliminary crystallographic data of recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1). *J Mol Biol*, 244 (5):657-658.
- Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S. 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*, 420 (6916):636-642.
- Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Baban K, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S. 2003. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3:52-58.
- Gurdon JB, Mitchell A, Mahony D. 1995. Direct and continuous assessment by cells of their position in a morphogen gradient. *Nature*, 376 (6540):520-521.
- Gurdon JB, Harger P, Mitchell A, Lemaire P. 1994. Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature*, 371 (6497):487-492.
- Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E. 1999. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, 274 (38):27161-27167.
- Hanaoka E, Ozaki T, Nakamura Y, Moriya H, Nakagawara A, Sakiyama S. 2000. Overexpression of DAN causes a growth suppression in p53-deficient SAOS-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 278 (1):20-26.
- Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. 1994. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. *Prostate*, 24 (4):204-211.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659):465-471.
- Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, 6 (4):432-438.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 274 (28):19838-19845.
- Hong JH, Lee GT, Lee JH, Kwon SJ, Park SH, Kim SJ, Kim IY. 2009. Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology*, 128 (1 Suppl):e442-450.
- Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL. 1996. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*, 85 (4):489-500.
- Huang HJ, Wu JC, Su P, Zhirnov O, Miller WL. 2001. A novel role for bone morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 142 (6):2275-2283.
- Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M. 2000. Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene*, 19 (36):4134-4145.

- Inagaki K, Otsuka F, Suzuki J, Kano Y, Takeda M, Miyoshi T, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. 2006. Involvement of bone morphogenetic protein-6 in differential regulation of aldosterone production by angiotensin II and potassium in human adrenocortical cells. *Endocrinology*, 147 (6):2681-2689.
- Kaivo-oja N, Jeffery LA, Ritvos O, Mottershead DG. 2006. Smad signalling in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, 4:21.
- Kamaraju AK, Roberts AB. 2005. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem*, 280 (2):1024-1036.
- Kang MH, Kim JS, Seo JE, Oh SC, Yoo YA. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. *Exp Cell Res*, 316 (1):24-37.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 1):1755-1766.
- Katoh M, Terada M. 1996. Overexpression of bone morphogenetic protein (BMP)-4 mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type. *J Gastroenterol*, 31 (1):137-139.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9 (1):49-61.
- Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. 1996. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*, 271 (5247):360-362.
- Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M. 1999. Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology*, 116 (5):1202-1216.
- Kowit JD, Maloney J. 1982. Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal Biochem*, 123 (1):86-93.
- Langenfeld EM, Langenfeld J. 2004. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res*, 2 (3):141-149.
- Langenfeld EM, Kong Y, Langenfeld J. 2006. Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5. *Oncogene*, 25 (5):685-692.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. 2003. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis*, 24 (9):1445-1454.
- Liu F, Bloch N, Bhushan KR, De Grand AM, Tanaka E, Solazzo S, Mertyna PM, Goldberg N, Frangioni JV, Lenkinski RE. 2008. Humoral bone morphogenetic protein 2 is sufficient for inducing breast cancer microcalcification. *Mol Imaging*, 7 (4):175-186.
- Loesch M, Chen G. 2008. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Front Biosci*, 13:3581-3593.
- Loh K, Chia JA, Greco S, Cozzi SJ, Buttenshaw RL, Bond CE, Simms LA, Pike T, Young JP, Jass JR, Spring KJ, Leggett BA, Whitehall VL. 2008. Bone morphogenetic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*, 47 (6):449-460.
- Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem*, 273 (40):25628-25636.
- Massague J, Chen YG. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, 14 (6):627-644.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, 7 (12):1191-1204.
- Miyazono K. 2000. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci*, 113 (Pt 7):1101-1109.
- Mulder KM. 2000. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11 (1-2):23-35.

- Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*, 14 (7):2809-2817.
- Murakami M, Kawachi H, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M. 2009. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-beta signaling pathways. *Genes Cells*, 14 (4):469-482.
- Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S, Saeki-Miura K, Makishima F. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res*, 250 (2):351-363.
- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*, 277 (7):5330-5338.
- Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H. 1990. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J*, 9 (7):2085-2093.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. 1996. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, 86 (4):589-598.
- Rabenoelina F, Semlali A, Duchesne MJ, Freiss G, Pons M, Badia E. 2002. Effect of prolonged hydroxytamoxifen treatment of MCF-7 cells on mitogen activated kinase cascade. *Int J Cancer*, 98 (5):698-706.
- Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131 (11):741-750.
- Reilly GC, Golden EB, Grasso-Knight G, Leboy PS. 2005. Differential effects of ERK and p38 signaling in BMP-2 stimulated hypertrophy of cultured chick sternal chondrocytes. *Cell Commun Signal*, 3 (1):3.
- Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. 2002. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat*, 74 (3):255-269.
- Rosendahl A, Pardali E, Speletas M, Ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. 2002. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27 (2):160-169.
- Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotsch A, Sebald W, Mueller TD. 2008. Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J*, 275 (1):172-183.
- Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 287 (1):103-115.
- Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. 2006. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants*, 16 (1):61-69.
- Seton-Rogers SE, Brugge JS. 2004. ErbB2 and TGF-beta: a cooperative role in mammary tumor progression? *Cell Cycle*, 3 (5):597-600.
- Shafer LM, Slice LW. 2005. Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38(MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1745 (3):393-400.
- Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F. 2003. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl*, 61:323-337.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 25 (1):72-101.
- Simeoni I, Gurdon JB. 2007. Interpretation of BMP signaling in early *Xenopus* development. *Dev Biol*, 308 (1):82-92.
- Sjodal M, Edlund T, Gunhaga L. 2007. Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes *ex vivo*. *Dev Cell*, 13 (1):141-149.

- Smith JC. 1995. Mesoderm-inducing factors and mesodermal patterning. *Curr Opin Cell Biol*, 7 (6):856-861.
- Smith WC, Harland RM. 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*, 70 (5):829-840.
- Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H. 2004. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res*, 95 (8):773-779.
- Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. 2002. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, 123 (3):363-369.
- Steinert S, Kroll TC, Taubert I, Pusch L, Hortschansky P, Hoffken K, Wolfl S, Clement JH. 2008. Differential expression of cancer-related genes by single and permanent exposure to bone morphogenetic protein 2. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134 (11):1237-1245.
- Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ, Emanuel BS, Altherr MR, McPherson JD, Wozney JM, Kaplan FS. 1991. Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics*, 9 (2):283-289.
- Tada A, Nishihara T, Kato H. 1998. Bone morphogenetic protein 2 suppresses the transformed phenotype and restores actin microfilaments of human lung carcinoma A549 cells. *Oncol Rep*, 5 (5):1137-1140.
- Takahashi M, Otsuka F, Miyoshi T, Otani H, Goto J, Yamashita M, Ogura T, Makino H, Doihara H. 2008. Bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and BMP7 inhibit estrogen-induced proliferation of breast cancer cells by suppressing p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Endocrinol*, 199 (3):445-455.
- Taylor IC, Roy S, Yaswen P, Stampfer MR, Varmus HE. 1995. Mouse mammary tumors express elevated levels of RNA encoding the murine homology of SKY, a putative receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 270 (12):6872-6880.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. 1995. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*, 39 (1):35-50.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. 1996. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec*, 245 (2):151-161.
- Tribulo C, Aybar MJ, Nguyen VH, Mullins MC, Mayor R. 2003. Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development*, 130 (26):6441-6452.
- Ueda Y, Wang S, Dumont N, Yi JY, Koh Y, Arteaga CL. 2004. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility. *J Biol Chem*, 279 (23):24505-24513.
- Upton PD, Long L, Trembath RC, Morrell NW. 2008. Functional characterization of bone morphogenetic protein binding sites and Smad1/5 activation in human vascular cells. *Mol Pharmacol*, 73 (2):539-552.
- Valcourt U, Gouttenoire J, Moustakas A, Herbage D, Mallein-Gerin F. 2002. Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem*, 277 (37):33545-33558.
- Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. 2003. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem*, 278 (3):1585-1593.
- von Bubnoff A, Cho KW. 2001. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, 239 (1):1-14.
- Wang SE, Xiang B, Guix M, Olivares MG, Parker J, Chung CH, Pandiella A, Arteaga CL. 2008. Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab. *Mol Cell Biol*, 28 (18):5605-5620.

- Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL. 1999. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development*, 126 (18):4005-4015.
- Wilson PA, Lagna G, Suzuki A, Hemmati-Brivanlou A. 1997. Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development*, 124 (16):3177-3184.
- Yamashita H, Miyazono K. 1999. [Bone morphogenetic protein (BMP) receptors and signal transduction]. *Nippon Rinsho*, 57 (1):220-226.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K. 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol*, 130 (1):217-226.
- Ye L, Lewis-Russell JM, Sanders AJ, Kynaston H, Jiang WG. 2008. HGF/SF up-regulates the expression of bone morphogenetic protein 7 in prostate cancer cells. *Urol Oncol*, 26 (2):190-197.
- You L, Kruse FE. 2002. Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (1):72-81.
- Yu L, Hebert MC, Zhang YE. 2002. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J*, 21 (14):3749-3759.
- Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. 2008. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*, 4 (1):33-41.
- Yuen HF, Chan YP, Cheung WL, Wong YC, Wang X, Chan KW. 2008. The prognostic significance of BMP-6 signaling in prostate cancer. *Mod Pathol*, 21 (12):1436-1443.
- Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86 (4):599-606.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. hum. biol. Joachim Clement, Susanne Steinert
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 01.11.2011

Franziska Heuchel, Verfasserin